

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-84589

(43) 公開日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 5/10			C 1 2 N 9/64	Z
9/64			G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/574			C 0 7 K 16/40	
審査請求 未請求 請求項の数13 F D (全 42 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平8-200984	(71) 出願人	390010205 富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地
(22) 出願日	平成8年(1996)7月12日	(72) 発明者	清木 元治 石川県金沢市涌波3丁目10番14号
(31) 優先権主張番号	特願平7-200319	(72) 発明者	佐藤 博 石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和 宿舍C57-11
(32) 優先日	平7(1995)7月14日	(74) 代理人	弁理士 水野 昭宣
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 新規なタンパク質

(57) 【要約】

【課題】 癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段に、さらにその他の医学的生理学的用途に有用な新規なタンパク質及びそれをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 ヒト癌細胞表層で特異的に発現している潜在型MMP-2の活性化能を有し且つMMPの一種であるMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子であるMT-MMP-3、それをコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該マトリックスメタロプロテアーゼの製造方法、該マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、さらにはそれらタンパク質及び抗体の用途。

(2)

特開平9-84589

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩。

【請求項2】 該タンパク質がMT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであることを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 C末端領域に、配列表の配列番号：2のAla⁵⁶¹～Phe⁵⁸¹で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1又は2記載のタンパク質。

【請求項4】 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するMT-MMP-3またはその塩であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載のタンパク質。

【請求項5】 外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一記載のタンパク質。

【請求項6】 配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載のタンパク質。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸。

【請求項9】 請求項2～4のいずれか一記載のMT-MMP-3をコードする塩基配列を有するDNA遺伝子であることを特徴とする請求項8記載の核酸。

【請求項10】 配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうちオープンリーディングフレーム部分又はそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする請求項8又は9記載の核酸。

【請求項11】 請求項8～10のいずれか一記載の核酸を含有することを特徴とするベクター。

【請求項12】 請求項8～10のいずれか一記載の核酸又は請求項11記載のベクターを保有することを特徴とする形質転換体。

【請求項13】 請求項12記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を包含する請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩を包含する請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段として、あるいはその他の医学的生理学的用途に有用な、新規なタンパク質及びそれをコードする遺伝子に関するものである。特に本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である新規な膜結合型タンパク質及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳しくは、本発明はヒト癌細胞表層で特異的に発現している新規マトリックスメタロプロテアーゼ〔本発明で明らかにされた新規マトリックスメタロプロテアーゼをMT-MMP-3 (Membrane-Type Matrix metalloproteinase-3) と命名する〕、それをコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該マトリックスメタロプロテアーゼの製造方法、該マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、さらにはそれらタンパク質及び抗体の用途に関するものである。

【0002】

【従来技術】原発巣組織内に存在する癌細胞が浸潤、転移するためには、その周囲に存在する細胞外マトリックスが、癌細胞の移動の障害になる。したがって、癌細胞が組織を浸潤し転移するには、原発巣からの遊離、周辺の細胞外マトリックスの破壊が必要となる。癌細胞の転移は、その後基底膜の破壊、血管への侵入、侵出、二次臓器への生着、増殖等の段階を経て成立する。癌細胞の転移の障壁となっている細胞外マトリックスは、I V型コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸等の複雑な成分から構成されているが、この細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMPと略記する）と総称される一群の酵素が関与している。

【0003】これまでにMMPとして間質型コラーゲナーゼ（MMP-1）、72 kDa ゼラチナーゼ（I V型コラーゲナーゼあるいはゼラチナーゼAともいう：MMP-2）、92 kDa ゼラチナーゼ（I V型コラーゲナーゼあるいはゼラチナーゼBともいう：MMP-9）、ストロムライシン-1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラーゲナーゼ（MMP-8）、ストロムライシン-2（MMP-10）、ストロムライシン-3（MMP-11）等が報告されている（C r i t. Rev. Oral. Biol. Med., 4:197～250, 1993）。これらのMMPはファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。これらのMMPのcDNAデータから推定されるアミノ酸配列には相同性が認められており、基本的に分泌産生時に除かれるN末端のシグナルペプチドに続き、プロペ

(3)

特開平9-84589

3

チドドメイン、 Zn^{2+} 結合触媒ドメイン、5～50アミノ酸よりなるプロリンに富んだヒンジドメイン、C-末端のヘモペキシン凝血酵素様ドメインから構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。MMP-2とMMP-9では、この他にゼラチン結合ドメインを含んでいる。

【0004】これらのMMPのうち、基底膜の主要構造体であるIV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラーゲナーゼ（MMP-2とMMP-9）は、高転移性の癌細胞における高い発現が数多く報告され、癌細胞の基底膜浸潤への関与が提唱されてきた（Cell., 64:327～336, 1991）。MMPの活性発現調節は、少なくとも転写レベル、酵素活性を示さない潜在型酵素から活性型酵素への活性化の段階、MMPの特異的阻害剤であるティッシュ インヒビター オブメタロプロテアーゼ（TIMP）による活性調節などといった段階で行われていると考えられている（Trends Genet., 6:121～125, 1990）。全てのMMPは不活性な潜在型として分泌されるが、In vitroの実験では、MMP-1、MMP-9の活性化は、プラスミン、トリプシン、カテプシンG等のセリンプロテアーゼによって生じることが示されており、さらに、MMP-9の活性化が活性型MMP-3の作用によっても引き起こされることが報告されている（J. Biol. Chem., 267:3581～3584, 1992）。しかしながら、MMP-2が上述のプロテアーゼの切断部位を持たないため、MMP-2の活性化は、これらによっては起こらないと考えられている（Curr. Opin. Cell Biol., 5:891～897, 1993）。

【0005】一方、これらのMMPは、必ずしも癌細胞だけから産生されている訳ではなく、周辺の線維芽細胞や炎症細胞からもそれぞれ異なるMMPが産生されていることも報告されている（Breast Cancer Res. Treat., 24:209～218, 1993. Curr. Opin. Cell Biol., 5:891～897, 1993）。中でもMMP-2は、組織構築の改変を伴うような様々な部位の線維芽細胞で発現しているが、正常組織と癌組織のMMP-2を比較するとその活性化が癌組織で特異的に生じていることが肺癌の例等で報告されている（Clin. Exp. Metastasis, 11:183～189, 1993）。MMP-9では、活性型が検出される頻度は低い。また、癌細胞の浸潤の先端（invadopodia）で活性型MMP-2が局在することがIn vitroの実験系で示され、癌細胞浸潤における重要性が示唆されている（Cancer Res., 53:3159～3164, 1993. Breast Cancer Res. Treat., 53:3159～3164, 1994）。

4

【0006】この様な背景から、MMP-2の活性化機構が注目されてきたが、前述の様にMMP-1、MMP-9の活性化がトリプシンなどのセリンプロテアーゼで誘導されるのに対し、MMP-2の活性化機構は不明であり、特に活性化因子は同定されていなかった。MMP-2の産生細胞であるHT1080細胞をコンカナバリンAや12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate（TPA）で処理すると活性型MMP-2が培養上清に出現することが知られており、これらの細胞では、MMP-2の活性化因子が誘導されていると考えられる（J. Natl. Cancer Inst., 85:1758～1764, 1993. Clin. Exp. Metastasis, 11:183～189, 1993）。このMMP-2の活性化が細胞膜画分により誘導されること、キレート剤やTIMPによって活性化が抑制されることから、活性化因子は膜結合型のMMPの1種であることが想定された（J. Biol. Chem., 268:14033～14039, 1993）。

【0007】本発明者らは、先に遺伝子工学的手法により新規なMMP遺伝子のクローニングを行い、C末端に典型的なトランスメンブレン・ドメインを持ち、MMP-2を活性化する新しいMMPをコードする遺伝子をクローニングした（Nature, 370:61～65, 1994）。実際、この遺伝子を培養細胞で発現させると、その遺伝子産物は分泌されることなく細胞膜上に局在したことから、本発明者らはこういったMMPをMT-MMP（membrane-type MMP）と命名した。これまで述べてきたようにMMPとりわけMMP-2は、その活性型が癌細胞特異的に見出されることから、抗癌、癌などに対する抗転移薬の標的として益々認識されつつある。しかしながら、MMP-2は正常組織においても潜在型として比較的恒常的に存在することから、活性発現調節は活性化酵素への活性化の過程にあり、その鍵を握る活性化因子の探索、同定は癌の診断、悪性度の判定マーカー及び癌などに対する抗転移薬剤の標的として極めて重要であると考えられる。

【0008】また、アルツハイマー病の発症に関与するβアミロイドタンパク質の切断におけるMMP-2の関与が指摘されている。βアミロイドタンパク質はアミロイドタンパク質前駆体の一部であり、βアミロイドタンパク質領域は、その1/4がアミロイドタンパク質前駆体の膜貫通領域に含まれ、残りは細胞外に出ている。最近、アミロイドタンパク質前駆体の複数の代謝が明らかにされたが、その一つは、αセクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによりβアミロイドタンパク質領域内を切断され、細胞外放出されるものである。最近、MMP-2にαセクレターゼ様のβアミロイドタンパク質分解活性が見出され、MMP-2がαセクレターゼあるいは細胞外でのβアミロイドタンパク質分解酵素として機能して

(4)

特開平9-84589

5

いる可能性が指摘されている(Nature, 362: 839, 1993)。βアミロイドタンパク質は、アルツハイマー病患者の脳で観察される老人斑の主成分であり、βアミロイドタンパク質の自己凝集と沈着により老人斑のコアを形成する。アルツハイマー病の患者の脳ではβアミロイドタンパク質分解酵素の機能低下が生じている可能性もあることからMMP-2が注目されているが、やはりその鍵を握るのはMMP-2の活性化の過程である。先に本発明者らが同定したMT-MMP(新たに、ここで「MT-MMP-1」と名付けられた)はMMP-2の活性化因子であると考えられるが、MT-MMP-1のような未知のMMPが存在することは、細胞外マトリックスには多様な構成成分が存在することからも充分に予想され、MT-MMP-1以外のMMP-2の活性化因子の存在も否定できない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外であって潜在型MMP-2活性化能を有する潜在型MMP-2活性化因子である新規なタンパク質及びそれをコードする遺伝子、該潜在型MMP-2活性化因子である新規なタンパク質の製造方法及び該タンパク質及び該遺伝子の用途等を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、潜在型MMP-2の活性化が癌細胞膜画分により誘導されること、キレート剤やTIMPによって活性化が抑制されることから活性化因子は膜結合型のMMPの1種であると想定されていることに着目し、先に潜在型MMP-2活性化能を有する新規なMMPをコードする遺伝子を単離したが、これ以外にもMMP-2の活性化因子として作用するMMPや生化学的に既知のMMPと異なるMMPが存在するのではないかと考え、遺伝子工学的手法を用い種々研究した結果、新たな潜在型MMP-2活性化能を有するMMPをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0011】現在まで、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPとしてMT-MMP-1が知られていたが、それ以外の潜在型MMP-2活性化因子については同定されていなかった。本発明者により新規な潜在型MMP-2活性化因子たるMMPの遺伝子がクローニングされ、遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列の全てが明らかにされるに至った。本発明者らは、この新規なMMPを当初MT-MMP-2と命名した(平成7年(1995年)7月14日に日本国に出願された特願平7-200319号並びに特願平7-200320号)が、ゴードン リサーチコンファレンス オン マトリックス メタロプロテアーゼズ(アンドーバーエヌエイチ 1995年7月16-21日) [Gordon Research Conferen

6

ce onMatrix Metalloproteinases (Andover, NH July 16-21, 1995)]において、このものは新たに「MT-MMP-3」と呼ぶべきものとされ、そこに於いて「MT-MMP-3」と呼称するとの合意がなされた(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry), Vol. 270, pp.23013-23020 (1995))。したがって、本MT-MMP-3は、特願平7-200319号並びに特願平7-200320号に記載のMT-MMP-2と同一のものを指しているのである。

【0012】すなわち、本発明は新規なタンパク質、MT-MMP-3及びその類縁体に関わるものである。さらに本発明は新規なMT-MMP-3の全体又は一部をコードするDNA配列、このようなDNA配列を有するベクター及びこのようなベクターで形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞にも関する。さらに組換えMT-MMP-3の製造方法及びその用途も包含している。またMT-MMP-3に特異的に結合する抗体にも関する。別の観点からは上記の産物を用いた測定試薬、その試薬を用いた測定方法にも関する。特に、生体内及び生体外でのMT-MMP-3を測定する手法も提供される。本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩を用いて得られた抗体、特にモノクローナル抗体、その抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段に関する。

【0013】特に本発明は、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP-3と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩を用いて得られた抗体、特にモノクローナル

50

(5)

特開平9-84589

7

抗体、その抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段に関する。好ましくは、本発明では、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とするMT-MMP-3またはその塩が挙げられる。

【0014】本発明は、(1)潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、(2)該タンパク質がMT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであることを特徴とする上記第(1)項記載のタンパク質、(3)C末端領域に、配列表の配列番号：2のAla⁵⁶¹～Phe⁵⁸⁴で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記第(1)又は(2)項記載のタンパク質、(4)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するMT-MMP-3またはその塩であることを特徴とする上記第(1)～(3)項のいずれか記載のタンパク質、(5)外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであることを特徴とする上記第(1)～(4)項のいずれか記載のタンパク質、(6)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記第(1)～(5)項のいずれか記載のタンパク質、(7)上記第(1)～(6)項のいずれか記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

【0015】(8)上記第(1)～(7)項のいずれか記載のタンパク質又はその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸、(9)上記第(2)～(4)項のいずれか記載のMT-MMP-3をコードする塩基配列を有するDNA遺伝子であることを特徴とする上記第(8)項記載の核酸、(10)配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうちオープンリーディングフレーム部分又はそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする上記第(8)又は(9)項記載の核酸、(11)上記第(8)～(10)項のいずれか記載の核酸を含有することを特徴とするベクター、(12)上記第(8)～(10)項のいずれか記載の核酸又は上記第(11)項記載のベクターを保有することを特徴とする形質転換体、及び(13)上記第(12)項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を包含する上記第(1)～(6)項のいずれか記載のタンパク質又はその部分ペ

8

プチドを生成せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩を包含する上記第(1)～(6)項のいずれか記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法を提供する。

【0016】本発明に従えば、次のような態様、すなわち(14)潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩に対する抗体、(15)MT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)項記載の抗体、(16)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するMT-MMP-3又はその塩であるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)又は(15)項記載の抗体、(17)外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであるか、あるいは真核生物で発現させて得たものであるタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(16)項のいずれか記載の抗体、(18)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(17)項のいずれか記載の抗体、(19)タンパク質の部分ペプチド又はその塩に対する抗体であることを特徴とする上記第(14)～(18)項のいずれか記載の抗体、(20)抗血清であることを特徴とする上記第(14)～(19)項のいずれか記載の抗体、(21)モノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(14)～(19)項のいずれか記載の抗体、(22)MT-MMP-3又はその塩に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(14)～(19)及び(21)項のいずれか記載の抗体、

【0017】(23)潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とする潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体の製造方法、(24)潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク

50

9

質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩で免疫した動物から得られた、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMT-MMP-3を包含するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記第(21)又は(22)項記載の抗体の産生方法、(25)潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を試薬として用いるか、あるいは上記第(14)～(22)項のいずれか一記載の抗体を試薬として用いることを特徴とするMT-MMP-3の検出・測定方法、(26)上記第(25)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3に対する抗体、(27)上記第(25)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩であることを特徴とする標識化されたタンパク質あるいは部分ペプチド又はその塩、(28)MT-MMP-3発現細胞あるいは組織の検出・測定方法に用いる潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質又はその部分ペプチドをコードすることを特徴とする標識化された核酸、及び(29)ハイブリダイゼーション・プローブであることを特徴とする上記第(28)項記載の核酸が提供される。

【0018】特に本発明は、(30)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とするMT-MMP-3またはその塩、(31)上記第(30)項記載のMT-MMP-3の部分ペプチドまたはその塩、(32)上記第(30)項記載のMT-MMP-3をコードする塩基配列を有するDNA遺伝子、(33)配列表の配列番号：1で表される塩基配列を有する上記第(32)項記載のDNA遺伝子、(34)上記第(32)項記載の遺伝子を含有するベクター、(35)上記第(32)項記載の遺伝子又は上記第(34)項記載のベクターを保有する形質転換体、及び(36)上記第(35)項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてMT-MMP-3またはその塩を生成

(6)

特開平9-84589

10

せしめることを特徴とするMT-MMP-3またはその塩の製造方法、(37)上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とするMT-MMP-3に対する抗体の製造方法を提供する。

【0019】本発明に従えば、特に次のような態様、すなわち(38)上記第(31)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、(39)抗血清であることを特徴とする上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、(40)モノクローナル抗体であることを特徴とする上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体、(41)上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩で免疫した動物から得られたMT-MMP-3に対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMT-MMP-3に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記第(40)項記載のMT-MMP-3に対するモノクローナル抗体の産生方法、(42)上記第(30)項記載のMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を試薬として用いるか、あるいは上記第(38)項記載のMT-MMP-3に対する抗体を試薬として用いることを特徴とするMT-MMP-3の検出・測定方法、(43)上記第(42)項記載のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩、及び(44)上記第(42)項記載のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3に対する抗体が提供される。

【0020】

【発明の実施の形態】潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であるがMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP(例えば、MT-MMP-3)と実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩を製造する方法、こうして得られた該タンパク質またはその塩やそのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩を用いて得られた抗体、特にモノクローナル抗体、その抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばDNA、RNAなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定診断手段が提供される。

【0021】より具体的には、本発明は配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とす

50

(7)

特開平9-84589

11

るMT-MMP-3またはその塩を提供する。本発明のMT-MMP-3としては、潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外であって潜在型MMP-2活性化能を有することを特徴とし潜在型MMP-2活性化因子でかつ新規なアミノ酸配列を有するものであればよい。より好ましくは本発明のMT-MMP-3としては、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。さらに本発明のMT-MMP-3としては、プレ部分として配列中のアミノ酸番号1位のMetから21位のPheまでのアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよく、プロ部分としてアミノ酸番号22位のPheから119位のArgまでのアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。本発明のMT-MMP-3は、配列表の配列番号：1で表される塩基配列の113から115位のATGから1922から1924位のGTGより構成される塩基配列にコードされるもの（1925から1927位の終止コドンTGAは、TAAまたはTAGでも有りうる）であることができるし、また、該塩基配列と相同性を有するが、MT-MMP-1以外の配列を持ち且つ潜在型MMP-2の活性化能を有するといったそれと同効の塩基配列を含有するDNA配列でコードされるものであることができる。該MT-MMP-3の塩基配列は、修飾（例えば、付加、除去、置換など）されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。

【0022】配列表の配列番号：1で表される塩基配列またはそれと同効の塩基配列を含有する本発明のDNAは、例えば以下に示す方法によって取得した。なお、遺伝子組換え技術は、例えばT. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. T. (1989); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法I」、東京化学同人（1986）；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸I（組換えDNA技術）」、東京化学同人（1992）；R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68, Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 & 101, Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153, 154 & 155, Academic Press, New York (1987) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。

【0023】種々のヒト組織（胎盤、口腔癌、肺癌等）あるいは培養細胞（ヒト線維肉腫細胞HT1080、ヒト単球性白血病細胞U937等）からmRNAを単離する。特に好適にヒト口腔癌細胞よりmRNAを単離できる。mRNAの単離は、当該分野で公知の方法あるいは

12

それと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. T. (1989); L. Grossman et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Part A & B, Academic Press, New York (1968); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.33 & p.215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979 などに記載の方法、例えばグアニジン-塩化セシウム法、チオシアン酸グアニジン法、フェノール法などの方法で行うことができる。必要に応じ、得られた全RNAはオリゴ(dT)-セルロースカラムなどを使用して精製してポリ(A)⁺mRNAを得ることが出来る。このmRNA及び逆転写酵素を用いてcDNAを作製する。mRNA及び逆転写酵素を用いてのcDNA合成は当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、H. Land et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 9, 2251 (1981); U. Gubler et al., "Gene", Vol. 25, 263-269 (1983); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p.307, Academic Press, New York (1987) などに記載の方法が挙げられる。

【0024】こうして作製されたcDNAを基にcDNAライブラリーを構築できる。またファージベクターを使用する以外で、大腸菌などの宿主細胞の形質転換をするには、例えばカルシウム法、ルビジウム/カルシウム法など当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., Vol. 166, p.557 (1983) など)。さらに市販の種々ヒト組織由来cDNAライブラリー（例えば、CLONTECHなどより入手可能）を直接使用することもできる。作製されたcDNAを鋳型にPCR増幅反応を行う。典型的な場合、既知のMMPファミリーのアミノ酸配列から選択した、高度に保存されているアミノ酸配列を基に、デジェネレイテッド・プライマーを作製する。プライマーの作製は、当該分野で知られた方法で行うことができ、例えばDNA自動合成装置を用い、フォスフォジエステル法、フォスフトリエステル法、フォスフォアミダイト法などにより合成できる。このプライマーと上記作製したcDNAとを用い、PCRを行う。PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); PCRテクノロジー (PCR Technology), ストックトンプレス (Stockton Press) などに記載された方法に従って行うことができる。

【0025】得られたPCR産物をクローニングし、得られたPCR産物の塩基配列を決定し、新規なMMP遺伝子配列を有するDNA断片を取得する。塩基配列の決

13

定は、ダイデオキシ法、例えばM13ダイデオキシ法など、Maxam-Gilbert 法などを用いて行うことができるが、市販のシークエンシングキット、例えば Taqダイプライマーサイクルシークエンシングキットなどを用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光DNAシーケンサー装置などを用いて行うことができる。特にはこのDNA断片をプローブに種々のヒト組織（胎盤、口腔癌、肺癌等）あるいは培養細胞（ヒト線維肉腫細胞HT1080、ヒト単球性白血病細胞U937等）から構築されたcDNAライブラリーをスクリーニングし、塩基配列の決定から目的とするDNAを単離することができる。好ましくは胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングし、塩基配列の決定をして目的とするDNAを単離する。なお、プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムDNAラベリングキット（Boehringer Mannheim）などを使用して行うことができる。

【0026】以下にさらに詳細に記述する。本発明者らは、既知のMMPファミリーの触媒ドメイン中から選択した高度に保存されているアミノ酸配列GEADILV及びGDAHFDDEを基に、次の配列を有する5'プライマー、

5P-4 配列番号：3

SGNVVNGCWGAYATMRTSAT

（配列中、S=C又はG、N=A又はC又はG又はT、V=A又はC又はG、W=A又はT、Y=C又はT、M=A又はC、R=A又はGのそれぞれのミックスド・ベースを示す）及び次の配列を有する3'プライマー、

3P-2 配列番号：4

YTCRTSNTCRTCRAARTGRRHRTCYCC

（配列中、Y=C又はT、R=A又はG、S=C又はG、N=A又はC又はG又はT、H=A又はC又はTのそれぞれのミックスドベースを示す）を設計、合成した。なお、上記の配列のうち、S、N、V、W、Y、M、R及びHはそこに複数の塩基を導入すること、そしてその結果マルチプルなヌクレオチド配列を生ずることを示している。プライマーはMMPファミリーに特徴的な領域のアミノ酸配列に基づいてデザインし、合成し、使用することができる。

【0027】これらのプライマーとヒト口腔癌細胞から調製したcDNAライブラリーを用い、PCR反応を行った。プライマーのデザインから予想されるサイズ（90から120b.p.）を持つところの得られたPCR産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した結果、MMP-1、MMP-9と同一な配列を持つPCR産物以外に、既知のMMPと相同性を有するが、配列が新規な93b.p.のDNA断片を得た。同様にこれらプライマーと各種のヒト細胞由来のcDNAライブラリーを用いて、MMP-1、MMP-9と同一な配列を持つP

(8)

特開平9-84589

14

CR産物以外に、既知のMMPと相同性を有するが、配列が新規なPCR産物を検索することもできる。この93b.p. DNA断片をプローブとして、ヒト胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、2.1kbのDNA断片が得られた。この断片の塩基配列の決定から配列表の配列番号：1で表される塩基配列が得られた。配列表の配列番号：1で表される塩基配列と同一の配列は、GENEBANK/EMBL DNA Data Base中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

【0028】配列表の配列番号：1で表される塩基配列を有する上記のクローンの塩基配列は、3'非翻訳配列と共に推定604個のアミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレームを有していた。開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号561から584に24個の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域の存在が認められた。こうして得られた新規MMPを「MT-MMP-3」と命名した（本発明者等は当初MT-MMP-2と呼称した（平成7年7月14日日本国出願の特願平7-200319号並びに特願平7-200320号）が、ゴードン リサーチ コンファレンス オン マトリックス メタロプロテアーゼズ（アンドーバー エヌエイチ 1995年7月16-21日）〔Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases (Andover, NH July 16-21, 1995)〕の会合での合意に基づいて新たにMT-MMP-3と呼ぶことになった）。

【0029】MT-MMP-3遺伝子産物の確認を、MT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションしたCOS-1細胞などの適した動物細胞などを用いて行った。この外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F. L. Graham et al., "Virology", Vol. 52, pp.456 (1973) など）、DEAE-デキストララン法（例えば、D. Warden et al., "J. Gen. Virol.", Vol. 3, pp.371 (1968) など）、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., "EMBO J", Vol. 1, pp.841 (1982) など）、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうしてMT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物を抗MT-MMP-3モノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験で解析した結果、細胞溶解物から64kDaのタンパク質が免疫沈降されたのに対し、培養上清からは相当するタンパク質は検出されなかった。すなわち、MT-MMP-3遺伝子産物は分泌されることなく、細胞表層上で発現していることが示唆された。図1～図5に示すように既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相

10

20

30

40

50

(9)

特開平9-84589

15

同性を調査した結果、MT-MMP-3は既知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP-3中で最も良好に保存されていた。また、MMPの1次構造上の特徴であるプロペプチドドメイン、Zn²⁺結合触媒ドメイン、プロリンに富んだヒンジドメイン、C-末端のヘモペキシン凝血酵素様ドメインは良好に保存されていた。

【0030】さらにMT-MMP-3では、MT-MMP-1（先に本発明者らが単離同定したMT-MMPはその区別をなすため「MT-MMP-1」と命名し直した）と同じくC末端領域に疎水性アミノ酸の連続した配列が存在することから、膜結合型のMMPであることが示唆された。このような疎水性アミノ酸の連続した配列は、他のMMPファミリーには存在しない。実際、遺伝子工学的にこの疎水性アミノ酸の連続配列を分泌タンパク質と融合させた融合タンパク質を作成し培養細胞で発現させたところ、融合タンパク質の分泌は抑えられ細胞膜上で発現したことから、この疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレン・ドメインとして機能していることが示された。したがって、MT-MMP-3遺伝子は、新規なMMPタンパク質をコードしていることは明白であり、MT-MMP-3遺伝子を用いて作製した組換え体プラスミドは全て新規な組換え体であり、そのプラスミドで形質転換あるいはトランスフェクトされ得られた形質転換体あるいはトランスフェクタントも新規なものである。

【0031】MT-MMP-3遺伝子を組込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、CHO細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適なコドンが導入されていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファン（trp）プロモーター、ラクトース（lac）プロモーター、トリプトファン・ラクトース（tac）プロモーター、リボプロテイン（lpp）プロモーター、λファージPLプロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SRαプロモーター等を、酵母を宿主とするプラス

16

ミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。

【0032】大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KS⁺ (Stratagene)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223 (Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、SV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、例えばpcD、pcD-SRα、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene)などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533 XL1-Blue、C600、DH1、HB101、JM109などが挙げられる。宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR⁻細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus) をベクターとし、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる。

【0033】本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることができる。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, Nucleic Acids Res, Vol. 13, r165 (1985); S. Linn et al. ed. Nucleases, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982などに記載のものが挙げられる。逆転写酵素としては、例えばマウスモロネイ白血病ウイルス (mouse Moloney leukemia virus; MMLV) 由来の逆転写酵素 (reverse transcriptase)、ニワトリ骨髓芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素などが挙げられ、

(10)

17

特にはRNase H 欠損体などは好ましく用いることが出来る。DNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌DNAポリメラーゼ、その誘導体であるクレノウ・フラグメント、大腸菌ファージT4 DNAポリメラーゼ、大腸菌ファージT7 DNAポリメラーゼ、耐熱菌DNAポリメラーゼなどが挙げられる。末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼとしては、例えばR. Wu et al.ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York(1983)に記載の3'-OH末端にデオキシヌクレオチド(dNMP)を付加するTdTaseなどが挙げられる。DNA修飾・分解酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなどが挙げられ、例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼI、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼII、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼIII、λエキソヌクレアーゼ、DNase I、ヌクレアーゼS1、マイクロコッカス(Micrococcus)ヌクレアーゼなどが挙げられる。DNAリガーゼとしては、例えば大腸菌DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼなどが挙げられる。DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、λファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACなどが挙げられ、好ましくはλファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、λgt10、λgt11、λDASHII、λFIXII、λEMBL3、λZAPIITM (Stratagene)などが挙げられる。

【0034】さらに、本発明に係わるMT-MMP-3の遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、MT-MMP-3のアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105(広瀬進)、東京化学同人(1986)；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、p233(広瀬進)、東京化学同人(1992)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York(1987)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York(1983)；J. A. Wells et al., "Gene", Vol. 34, p. 315(1985)；T. Grundstroem et al., "Nucleic Acids Res", Vol. 13, p. 3305(1985)；J. Taylor et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, p.8765(1985)；R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York(1987)；A. R. Oliphant et al., "Gene", Vol. 44, p.177(1986)などに記載の方法が挙げられる。例えば合成

特開平9-84589

18

オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)、Kunkel法、dNTP[αS]法(Eckstein)法、亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などに行うことができる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のMT-MMP-3と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。タンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するという事も含まれてよい。

【0035】かくして本発明は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。本発明は、MT-MMP-3に特有なアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。MMPの共通の特徴であるドメイン構造やC末端のトランスメンブレンドメイン構造が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のMT-MMP-3は天然のMT-MMP-3と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のMT-MMP-3と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。こうした本発明のMT-MMP-3は、下記で説明するように分離・精製処理されることができる。こうして得られた本発明の潜在型MMP-

(11)

特開平9-84589

19

2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMP（特に、MT-MMP-3）と実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、あるいはその部分ペプチドは、それを用いて酵素阻害剤の開発や探索などの研究、医薬品の開発研究、MT-MMP-3が関与すると考えられる生物学的な現象や反応の研究を行うことができるし、さらにはそれに対する抗体を作成するのに用いることができるし、特定の分析あるいは測定対象物を調査研究するのに使用することもできる。一方では、こうして本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有するMT-MMP-3のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。

【0036】本発明のDNA配列は、これまで知られていなかった哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えばMT-MMP-3及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。本発明のDNA配列は、例えばMT-MMP-3及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブとして有用である。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素（RT）を用いたPCR法（RT-PCR）を利用することが出来る。MT-MMP-3 cDNA及びその関連DNAは、クローニングされ、配列決定されたMT-MMP-3 cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNAプライマーをデザインして化学合成し、得られたDNAプライマーを用いて、PCR法、RT-PCR、その他の方法を用いてMT-MMP-3関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。MT-MMP-3がMT-MMP-1の構造的特徴を良好に保存していたことから、MT-MMP-3も潜在型MMP-2の活性化因子として作用する可能性が想定される。そこで、COS-1細胞などの哺乳動物細胞に潜在型MMP-2の発現プラスミド及びMT-MMP-3の発現プラスミドをコトランスフェクションし、回収された培養上清を用いてザイモグラフィーを行った。その結果、本来、分子量68kDaに検出される潜在型MMP-2以外に、62kDaの活性化型MMP-2及び64kDaの活性中間体が検出され、MT-MMP-3の発現に依存した潜在型MMP-2の活性化が観察された。

【0037】MT-MMP-3 mRNAのヒト組織中での発現を各種の組織由来Poly(A)⁺RNAに対するノーザンブロット分析により検討した。その結果、

20

ヒト肺、脳、胎盤で高い発現が認められたが、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、筋肉組織では検出されなかった。本発明者らの研究では、MT-MMP-1 mRNAの発現は肺、腎臓、胎盤で顕著に高いのに対し、脳では最も低かった。これらのことは、MT-MMP-3は、MT-MMP-1とは構造的にも潜在型MMP-2の活性化能という機能的にも非常に類似しているが、実際の組織中での遺伝子発現は異なる制御を受けていることを示している。本発明のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・ブロット、サザン・ブロット、in situハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中でのMT-MMP-3 mRNAの発現やMT-MMP-3遺伝子自体などを検出・測定でき、ひいては癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療、またアルツハイマー病の診断等の研究に応用できる。以上述べた、本発明者らの研究成果によりMT-MMP-3の遺伝子及び組換えDNA分子を宿主に移入し、MT-MMP-3を発現させ、目的とするMT-MMPを得る方法が提供される。こうして本発明によれば、MT-MMP-3の遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。別の面では、本発明は潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、より好ましくはMT-MMP-3またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つタンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物で発現させることを可能にするDNAやRNAなどの核酸に関することができる。またこうした核酸、特にDNAは、（a）配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、（b）該（a）のDNA配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び（c）該（a）又は（b）の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物も本発明の特徴をなす。

【0038】さらに、本発明では、本発明に係わるMT-MMP-3と特異的に結合するモノクローナル抗体などの抗体が提供される。本発明に係わるモノクローナル抗体などの抗体により、癌の診断はもとより癌の浸潤、転移に係わる研究に有用な研究手段、さらにはアルツハイマー病の発症機作や診断方法に係わる研究に有用な研究手段が提供される。本発明に係わるモノクローナル抗体などの抗体は、本発明により得られるヒトMT-MM

10

20

30

40

50

(12)

特開平9-84589

21

P-3を免疫原として公知の方法で動物を免疫したり、当該分野で知られたあるいは汎用されている方法、例えばミルシュタインらの方法(Nature, 256: 495~497, 1975)により製造することができる。この方法において、免疫原としては天然型MT-MMP-3、リコンビナントヒトMT-MMP-3及び連続した少なくとも8個のアミノ酸からなるMT-MMP-3の一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでも使用することができる。さらに該モノクローナル抗体は、常用される方法によって適宜標識することができる。標識としては、酵素、補欠分子類、色素物質、蛍光物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、放射性物質等を使用することができる。以下抗体の作製につき詳しく説明する。

【0039】本発明で使用するモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよいことはいうまでもない。本発明で使用するモノクローナル抗体は、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

【0040】1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、例えば天然由来のMT-MMP-3、本発明の方法に従い調製したリコンビナントMT-MMP-3を用いることができる。MT-MMP-3は、さらに免疫原性コンジュゲートなどにしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できる。こうした抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原を特異的に認識する抗体などを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。さらにMT-MMP-3は、それを断片

22

化したもの、あるいはクローニングされ、配列決定されたcDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成し、得られた合成ポリペプチド断片であってもよく、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテナータンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみを認識できるモノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることことができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。活性化結合基としては、(1)活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2)活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

【0041】2. 免疫原性抗原による動物の免疫
動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リビッドA、リボソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μ g/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。一方では、本発明に従えばリコンビナントMT-MMP-3を用い、MT-MMP-3に対するポリクローナル抗体及びその製造にも関する。こうした場合、使用される動物としては、哺乳動物や鳥類などが利用できるが、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツ

(13)

23

ジ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、サル、イヌ、ネコ、ニワトリなどが挙げられる。抗体は抗血清であってもよく、より精製されたものであってもよく、例えばその単離精製は下記モノクローナル抗体と同様に行うことができる。

【0042】3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunology, 6, 511-519, 1976)、SP2/O-Ag14 (SP2, Nature, 276, 269-270, 1978)、マウスミエローマMOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256, 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM培地 (DMEM培地)、RPMI-1640培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清 (FCS) などを加え、さらに8-アザグアニン (例えば5-45 µg/ml) を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2-5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

【0043】4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2-5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3. の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地 (MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス (HVJ: Hemagglutinating virus of Japan) なども挙げられる。好ましくは、例えば30-60%のポリエチレングリコールを0.5-2ml加えることができ、分子量が1,000-8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000-4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30-

特開平9-84589

24

60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞 (リンパ球): ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1-20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1-7:1とすることができ。融合反応を1-10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0044】5. ハイブリドーマ (融合細胞) の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1-3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようにすることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8-16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1-4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析 (RIA)、酵素免疫分析 (ELISA)、蛍光免疫分析 (FIA) などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置 (FACS) などで、MT-MMP-3あるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0045】6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、

(14)

25

あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAEセファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0046】またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。標識物を付与する抗体としては、I g G画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど）、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもあるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、MT-MMP-3に対する抗体の一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちMT-MMP-3の量と比例する。このアッセイでは、不溶性抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード（forward）サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体

特開平9-84589

26

中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

【0047】抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性を導入してあるものが挙げられる。さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

【0048】これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られるMT-MMP-3に対し特異的に結合するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結

(15)

27

合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

【0049】代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレーエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリ・フォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

【0050】本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1, 2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオ

特開平9-84589

28

リンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

【0051】縮合剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N, N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N, N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(S PDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S MCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセートなどが挙げられる。

【0052】本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~9に保つように適当な緩衝液系中で行うことがで

(16)

29

きる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセート緩衝剤、クエン酸緩衝剤、フوسفート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗体抗原反応は約0℃～60℃の間の温度で行うことが好ましい。

【0053】酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗体抗原反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示信号を検知して測定することもできる。抗体抗原反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗体抗原反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることが出来る。本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうが、好ましくは生物由来の試料、例えば血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。なお、本発明のDNAも上記抗体と同様に処理することが出来、それ自体公知の方法又はそれと実質的に同様な方法で標識されたり、測定に用いることができることは理解されるべきである。

【0054】本発明の前述した種々の態様を利用することにより、癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段として、あるいはその他の医学的生理学的用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定

特開平9-84589

30

されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。なお、明細書及び図面において、塩基及びアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、アミノ酸に光学異性体が存在する場合は、特に断らないかぎりL-体を示す。後述の実施例1(e)で得られた大腸菌NM533 XL1-Blue(XL1-Blue/MMP-X2)は、平成7年7月5日(原寄託日)から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されており(微工研菌寄第P-15033号)、平成8年7月1日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号FERMBP-5573としてNIBHに保管されている。後述の実施例3(f)～(h)で得られたマウス由来単クローン性抗ヒト膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ-3(MT-MMP-3)抗体産生ハイブリドーマ(117-4E1)は、平成7年7月5日(原寄託日)から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されており(微工研菌寄第P-15031号)、平成8年7月1日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、寄託番号FERMBP-5572としてNIBHに保管されている。

【0055】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されることなく様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

実施例1 新規なメタロプロテアーゼ(MT-MMP-3)cDNAの単離

新規なMMPcDNAの単離は基本的に以下の方法にしたがって行った。

1) MMPファミリーで保存されている配列からデジェネレイテッドプライマーを合成し、ヒト組織由来cDNAのスクリーニングを行い、PCR産物を得る。

2) 得られた部分的クローンをプローブとして、cDNAライブラリーよりcDNA全長をスクリーニングする。

(a) cDNAライブラリーの構築

cDNAライブラリー作製に用いるRNAソースとしては、種々ヒト組織(胎盤、口腔癌、肺癌等)あるいは培養細胞(ヒト線維肉腫細胞HT1080、ヒト単球性白血病細胞U937等)から抽出した全RNAを使用することができる。本実施例では、口腔癌組織由来RNAを出発材料として行った結果を示した。組織からの全RNAの抽出は、グアニジン塩化セシウム法(Biochemistry, 18:5294～5299, 1979)にしたがって行い、得られた全RNAよりポリ

(A)⁺mRNAをオリゴ(dT)-セルロースカラムを使用して精製した。

(17)

特開平9-84589

31

【0056】cDNAの合成はガブラー&ホフマンの方法(Gene, 25:263~269, 1983)にしたがって行った。精製したポリ(A)⁺mRNAをテンプレート、ランダムヘキサマーあるいはオリゴdTをプライマーとし、SuperScript逆転写酵素(Stratagene)を用いて1st strand cDNAを合成した。これをRNase Hで処理し、続いて大腸菌DNAポリメラーゼIを用いて、2nd strand cDNAを合成し2本鎖cDNAを作製した。cDNAの第1鎖の合成は、5 μ lのポリA⁺mRNA画分サンプル、2 μ lのランダム・ヘキサマー(80 μ M)及び反応用緩衝液4.5 μ lの混合物を70℃で10分間インキュベーション処理した後、氷で冷却し、これに5 \times 反応用緩衝液4 μ l、0.1Mのジチオスレート(DDT)2 μ l、10mM dNTPs 1 μ l及びRNaseインヒビター1 μ lを加え、良く混合し、0.5 μ l(約100ユニット)のSuperScript reverse transcriptase(GIBCO BRL)を加え、37℃で1時間インキュベーション処理した後、70℃で10分間処理した。cDNAの第2鎖の合成は、同様にして処理して実行できる。cDNAライブラリーの構築は、例えば λ gt11を使用して行うことができる。合成した2本鎖cDNAをT₄DNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIメチラーゼによりcDNA中に存在するEcoRIサイトをメチル化する。さらにEcoRIリンカーd(pGGAATTCC)をT₄DNAリガーゼで連結し、EcoRI消化することにより両末端にEcoRIサイトを有するcDNAを構築した。このcDNAを λ gt11のEcoRIサイトへクローニングした。次にこのcDNAをインビトロパッケージングキットによりパッケージングし、cDNAライブラリーを構築する。cDNAライブラリーとしては市販の種々ヒト組織由来cDNAライブラリー(CLONTECH)を直接使用することもできる。

【0057】(b)新規なMMP cDNA断片の増幅得られたcDNAをテンプレートとし、MMPファミリーで保存されているアミノ酸配列を基に合成したデジェネレイトドプライマー及びTaq DNAポリメラーゼを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション法(PCR)を行った。新規なMMP cDNA断片のPCR増幅は、例えばR. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); PCRテクノロジー(PCR Technology), ストックトンプレス(Stockton Press)などに記載された方法に従って行われた。1 μ lの上記工程の反応生成物を鋳型として用い、5 μ lの10 \times PCR緩衝液、1 μ lの25mM dNTPs、1 μ lの増幅用プライマー及び1ユニットのTaq polymeraseの混合物を無菌蒸留水で50 μ lとした。この反応混合物を93℃で1分間、55℃で1分間そして72℃で1分

32

間を1サイクルとして、30サイクルのPCR増幅にかけた。

【0058】デジェネレイトドプライマーは、以下のように設計、合成した。既知のMMPファミリーの触媒ドメイン中から高度に保存されているアミノ酸配列として、GEADIMI(MMP-1のGly¹⁵⁵~Ile¹⁶¹、MMP-2のGly¹⁵⁵~Ile¹⁶¹、MMP-3のGly¹⁵⁵~Ile¹⁶¹、MMP-7のGly¹⁵⁰~Ile¹⁵⁶、MMP-8のGly¹⁵¹~Ile¹⁶⁰、MMP-9のArg¹⁶²~Ile¹⁶⁸、MMP-10のGly¹⁵⁴~Ile¹⁶⁰、MMP-11のGly¹⁵¹~Ile¹⁵⁷及びMMP-12のGly¹⁵⁵~Val¹⁶¹にそれぞれ相当する。アミノ酸番号は図1~図5記載の番号にしたがった)及びGDAHFDDE(MMP-1のGly¹⁵²~Glu²⁰¹、MMP-2のGly²⁰³~Glu²¹¹、MMP-3のAsn¹⁹²~Glu²⁰¹、MMP-7のGly¹⁸⁷~Glu¹⁹⁶、MMP-8のGly¹⁹¹~Glu²⁰⁰、MMP-9のGln¹⁹⁹~Glu²⁰⁸、MMP-10のTyr¹⁹¹~Glu²⁰⁰、MMP-11のGlu¹⁸⁸~Glu¹⁹⁷、MMP-12のGly¹⁹²~Glu²⁰¹にそれぞれ相当する。アミノ酸番号は図1~図5に記載の番号にしたがった)を選択した(プライマー部分に相当するアミノ酸配列のアミノ酸表記は一般的な1文字表記にしたがった)。このアミノ酸配列を基に、デジェネレイト・オリゴヌクレオチド・プライマーである、次の配列を有する5'プライマー(5'プライマー5P-4)

【0059】[配列番号:3]

5'-(C又はG)G(A又はC又はG又はT)(A又はC又はG)(A又はC又はG)(A又はC又はG又はT)GC(A又はT)GA(C又はT)AT(A又はC)(A又はG)T(C又はG)AT-3'

【0060】及び次の配列を有する3'プライマー

(3'プライマー3P-2)

【0061】[配列番号:4]

5'-(C又はT)TC(A又はG)T(C又はG)(A又はC又はG又はT)TC(A又はG)TC(A又はG)AA(A又はG)TG(A又はG)(A又はG)(A又はC又はT)(A又はG)TC(C又はT)CC

【0062】をDNAシンセサイザModel 392

(Applied Biosystems)を使用し、 β -シアノエチルフォスフォアミダイト法により合成した。上記配列中、括弧内に示された塩基はその複数の塩基を導入すること、そしてその結果マルチプルなヌクレオチド配列を生ずることを示している。括弧内複数の塩基は合成時に混合塩基を用いて導入した。この時、プライマー5P-4には5'側にBamHIサイト、プライマー3P-2には3'側にEcoRIサイトを導入した。得られたプライマー5P-4およびプライマー3P-2は10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で

(18)

33

平衡化したニックカラム (Pharmacia) を用い精製し、260 nm の吸光度を測定して 20 μ M に調整したものを用いた。

【0063】得られた PCR 産物を 10% アガロースゲル電気泳動で分離し、設定したプライマーから予想されるサイズ (90~120 bp) の PCR 産物、7 種類を抽出、精製した。精製した各 PCR 産物を BamHI 及び EcoRI で処理し、適当なプラスミド、例えば pBluescriptTM や pUC18 などの BamHI、EcoRI サイトにサブクローニングした。例えば、10 μ l の PCR 産物を 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して確認し、約 120~130 bp の PCR 産物を、プラスミド pBluescriptTM ベクターにサブクローニングした。1 μ l の PCR 産物、1 μ l の 10 \times ライゲーション緩衝液、2 μ l の再懸濁化ベクター液及び 1 μ l の T4 DNA リガーゼからなる反応混合物を 12 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーション処理した。得られたベクターを適当なコンペテント細胞 (例えば、大腸菌 HB101 や XL1-Blue のコンペテント細胞が使用できる) に TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコルに従い導入し、サブクローニングした。そのほか pUC119、pCRTM などのベクターを用いることもできる。クローン化した PCR 産物の塩基配列を蛍光 DNA シーケンサ Model 373A (Applied Biosystems)、Taq ダイプライマーサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) を使用し決定した。

【0064】決定したこれら 7 種の PCR 産物の塩基配列を既知 MMP の塩基配列と比較した結果、2 つは既に報告されている MMP-2 の塩基配列 (J. Biol. Chem., 261: 6600~6605, 1986) の一部と、1 つは MMP-9 の塩基配列 (J. Biol. Chem., 264: 17213~17221, 1989) の一部と一致した。残りの 4 種の PCR 産物の内、2 つは MMP とは無関係な塩基配列であったが、後の 2 つは 93 bp で同一の配列を有しており、MMP 遺伝子と相同性を示し推定されるアミノ酸配列も保存されていた。この PCR 産物を便宜的に MMP-X2 フラグメントと命名した。

【0065】(c) cDNA ライブラリーからの新規 MMP-3 遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前項 (b) で得られた MMP-X2 フラグメント (cDNA 断片) 25 ng を、例えば ランダムプライムド DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を使用して [α -³²P] dCTP (Amersham) を用いて標識し、2~5.0 CPM/ μ g の比活性を持つプローブを得た。これを種々のヒト組織または細胞由来 cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。(a) 項で記載した λ gt11

特開平 9-84589

34

中に構築したヒト口腔癌組織 cDNA ライブラリーを宿主菌大腸菌 Y1090 に 4×10^4 プラーク形成単位 / 15 cm² プレーットの濃度で感染させ、プラークを形成させた。まず、大腸菌 Y1090 株を 0.02% マルトースを含む L 培地で 1 晩培養後、集菌し、10 mM MgSO₄ に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し 37 $^{\circ}$ C 15 分間保温し、ファージを宿主菌に吸着させた。これに軟寒天を加え、予め作製しておいた 15 cm² の L プレート上に広げた。プレートを 42 $^{\circ}$ C で 1 晩保温し、プラークを形成させた後、ナイロンフィルター (例えば、ハイボンド (Hybond) -N、Amersham) あるいはニトロセルロースフィルター (例えば HATF、Millipore) をプレート上に置き、約 30 秒間放置した。膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液 (0.5 M NaOH 及び 1.5 M NaCl) に 1 分間浸した後、中和液 (1.5 M NaCl 含有 0.5 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8) に 15 分間浸した。このフィルターを 2 \times SSPE (0.36 M NaCl、20 mM NaH₂PO₄ 及び 2 mM EDTA) で洗浄した後、風乾した。上述のプラークのフィルターへの転写を繰り返し、少なくとも 2 枚のフィルターを調製する。但し、2 枚目以降のフィルターとプレートの接触時間は 2 分間程度に延長した。

【0066】このフィルターを 80 $^{\circ}$ C で 2 時間ベーキングし、DNA を固定した。1 つのプレートから調製した少なくとも 2 枚のフィルターをそれぞれ 42 $^{\circ}$ C、1 時間洗浄液 (1 M NaCl、1 mM EDTA 及び 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有 50 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0) で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% formamide、5 \times Denhardt's 溶液 (0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinylpyrrolidone)、5 \times SSPE、0.1% SDS、100 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA] に浸し、42 $^{\circ}$ C で 6~8 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に 100 $^{\circ}$ C、5 分間加熱変性させた (c) 項で記載した ³²P 標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42 $^{\circ}$ C で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の 0.1% SDS 含有 2 \times SSC 溶液で洗浄した。次にフィルターを 0.1% SDS 含有の 0.2 \times SSC 溶液中に 55 $^{\circ}$ C、30 分間置いた。この操作を 2 回繰り返したこのフィルターを風乾した後、X 線フィルム (Kodak XR) と重ね 80 $^{\circ}$ C で 12 時間オートラジオグラフィを行った。X 線フィルムを現像し、1 枚のプレートからできた 2 枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークする。マークしたシグナルに相当するプラークを SM 溶液 (100 mM NaCl 及び 10 mM MgSO₄ 含有 50 mM T

(19)

35

ris-HCl緩衝液、pH7.5)に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈して、好ましくは10~100プラーク形成単位/10cm²プレートの濃度に希釈して大腸菌を培養してある10cm²プレートにプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

【0067】(d)新規MT-MMP-3遺伝子を持つ組換え体λgt11 DNAの調製

クローン化したファージをそれぞれ前(c)項の記載と同様にプレーティングし42℃、3時間保温し、続いて37℃、1晩保温した後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を掻き取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になるようにポリエチレングリコール-6000(PEG-6000)を加え攪拌した後、4℃で1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファージ粒子を回収した。このファージ粒子をSM溶液に懸濁し、グリセロールグラジエント超遠心分離法(Molecular cloning, a laboratory manual, Ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory, 2nd Ed. 78, 1989)により精製した。得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase IおよびRNase Aで処理後、20mM EDTA、50μg/ml Proteinase K及び0.5% SDS混合液を加え65℃、1時間保温した。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10mM EDTA含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH8)に溶解した。

【0068】(e)挿入断片の塩基配列決定

前項(d)で調製したλgt11 DNAをEcoRIで分解し、挿入断片を分離精製後、ベクターpBlue script[™](Stratagene)のEcoRI部位にサブクローニングする。この組換え体pBlue scriptで大腸菌NM533 XL1-Blueを形質転換した。形質転換細胞をF'選択後、ヘルパーファージVCSM13(Stratagene)を感染させ終夜培養する。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG/NaClを加えファージを沈殿させる。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサModel 373A(Applied Biosystems)、Taqダイプライマーサイクルシーケンシングキット(Applied Biosystems)を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は2107bpであり、その配列は配列表の配列番号:1に記載した。GENBANK/EMBL DNA Data Baseを使用し、配列表

10

20

30

40

50

特開平9-84589

36

の配列番号:1に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。この約2.1kbのDNA配列中には、推定604アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームの存在が認められ、その推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号:2に記載した。この推定されるタンパク質を、「MT-MMP-3」と名付けた。得られたDNA断片をプラスミドPEX, pMEMneo, pKGなどのベクターに組み込み、大腸菌、CHO細胞などで発現させることができる。上記MT-MMP-3をコードする塩基配列を挿入したベクター(pSG5[™](Stratagene))を保有する大腸菌NM533 XL1-Blue(XL1-Blue/MMP-X2)は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5573として寄託保存されている(平成7年7月5日(原寄託日)に寄託された微工研菌寄第P-15033号(原寄託)よりブダベスト条約に基づく寄託への移管請求が平成8年7月1日にされた)。

【0069】(f)MT-MMP-3のアミノ酸配列解析

配列表配列番号:1に記載のMT-MMP-3の塩基配列から推定される配列表配列番号:2に記載したアミノ酸配列を既知のMMPsのアミノ酸配列と比較したアライメントを図1~図5に示した。配列表配列番号:2に示したアミノ酸配列は、MMPファミリーと高い相同性を示し、MMPファミリーに特徴的なドメイン構造、すなわち、分泌産生時に除去されるシグナルペプチド、プロペプチドドメイン、触媒ドメイン、ヒンジドメイン、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインが良好に保存されていた。特に、MMPファミリーで非常に高度に保存されているプロ体と活性型の切断部位近傍の配列PRCGVPDはMT-MMP-3でも完全に保存されており、また活性ドメインの配列も高い保存性を示した。Zn²⁺の結合部位を含む活性ドメインのアミノ酸配列をMT-MMP-3と他の既知のMMPと比較したところ、MT-MMP-1に対する相同性は66%と最も高く、また他のMMPに対する相同性もMMP-12に対して51%、MMP-2及びMMP-9に対して50%、MMP-1に対して49%、MMP-3に対して48%、MMP-8に対して47%、MMP-11に対して46%、MMP-7に対して44%の相同性を示した。

【0070】さらにMT-MMP-3のアミノ酸配列上で他のMMPと比較して特徴的な点は、3ヶ所の挿入配列が存在する点である。すなわち、プロペプチドドメインと触媒ドメインの間に存在するGSSKFHIRRKの配列からなる11アミノ酸残基の挿入配列-1(IS-1;配列表の配列番号:2のGly¹⁰⁹~Arg¹¹⁹)、触媒ドメイン中のPYSELENGの配列からなる8アミノ酸残基の挿入配列-2(IS-2;配列表の配列番号:2のPro¹⁷¹~Gly¹⁷⁸)及びトラン

(20)

37

スメンブレンドメイン様の24個の疎水性アミノ酸の連続配列AIAIVIPCILALCLLVLVYTVFQFを含む75アミノ酸残基の挿入配列-3 (IS-3; 配列表の配列番号: 2のAsp⁵³⁰ ~ Val⁶⁰⁴)が存在する。このような3ヶ所の挿入配列は、MMPファミリー中ではMT-MMP-1においてのみ存在し、他のMMPには認められなかった。MT-MMP-3における3ヶ所の挿入配列について位置及び構成するアミノ酸残基の数は、MT-MMP-1におけるそれとほとんど同じであったが、アミノ酸の組成は、MT-MMP-1のそれとは明らかに異なっており、IS-3のMT-MMP-1との相同性は37%であった。なお、全配列の相同性は43%であった。最初の挿入配列IS-1は例外的にMMP-1にも存在しているが、IS-1中で保存されている配列RXKRは、ズブチリシン様プロテアーゼの切断部位の配列であり、アミノ酸配列RXKRはズブチリシン様プロテアーゼによる多くの真核生物分泌タンパク質の切断部位であることが知られている (J. Biol. Chem., 266:12127~12130, 1991)。IS-3中の疎水性アミノ酸の連続配列はトランスメンブレンドメインと考えられ、MT-MMP-1の際立って特徴的な点であり (J. Biol. Chem.: 270, 801~805, 1995)、MT-MMP-3のIS-3中に存在する疎水性アミノ酸の連続配列もトランスメンブレンドメインと考えられた (実施例5参照)。本発明により単離されたMT-MMP-3 cDNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、他のMMPファミリーと相同性が高く、先に本発明者らが見出したMT-MMP-1とも類似しているが、詳細な点では明らかに異なり、また分子量も異なっていた。本発明のタンパク質は約69 kDaの分子量を有している。これらの配列上の特徴は、MT-MMP-1及びMT-MMP-3は、MMPファミリー中のサブファミリーを構成していることを示唆している。

【0071】実施例2 MT-MMP-3 mRNAの発現

(a) ヒト組織中での発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓各組織由来のpoly(A)⁺ RNAをプロットしてあるメンブレンHuman Multiple Tissue Northern Blots (Clontech)を用い、³²P標識した実施例1(e)項に記載した2.1 kbのcDNAをプローブとしてノーザンブロッティングを行った。プローブの標識は実施例1(c)項の記載と同様に行った。3×SSC (0.45M NaCl, 0.045M trisodium citrate 2H₂O, pH7.0)で湿らせたMultiple Tissue Northern Blotsのフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液 (0.75

38

特開平9-84589

M NaCl, 2.5mM EDTA, 0.5×Denhardt's溶液、50% formamide及び1% SDS含有20mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5) 10ml中で穏やかに攪拌しながら42℃で2~3時間プレハイブリダイズした。次にハイブリダイゼーション溶液 (プレハイブリダイゼーション溶液に10% sodium dextran, 20µg/ml変性サケ精子DNAを加えた溶液) 10mlに熱変性したプローブを加えプレハイブリダイゼーション溶液と交換し、43℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。

【0072】次にプロットを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に55℃、30分間置いた。このプロットをバイオイメージアナライザーBAS1000 (富士写真フィルム株式会社) でトレースし各組織におけるmRNAの発現強度を評価した。このとき、同じプロットを³²P標識したGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子 (CLONTECH) を用いてプロービングし、mRNAの内部標準とした。その結果を図6Aに示した。MT-MMP-3 mRNAのサイズは、何れの組織でも12 kbであり、調べた組織中、肺、脳、胎盤で高い発現を認めたが、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、骨格筋では検出されなかった。一方、同様にHuman Multiple Tissue Northern Blots (Clontech) を用い、³²P標識したMT-MMP-1 cDNAをプローブとしてノーザンブロッティングを行ったところ、4.5 kbに検出されたMT-MMP-1 mRNAは、肺、腎臓、胎盤で顕著に発現していたのに対し脳では最も低い発現であった。因みに、MT-MMP-1とMT-MMP-3のクロスハイブリダイゼーションは生じなかった。

【0073】(b) 培養癌細胞中での発現

種々ヒト培養癌細胞中でのMT-MMP-3 mRNAの発現を検討した。ヒト癌細胞として、喉頭癌由来細胞Hep2、膀胱癌由来細胞T24、肺癌由来細胞PC-3、胃癌由来細胞KKLS、NKPS及びMKN-28、骨肉腫由来細胞SK-ES-1及びU-20S、扁平細胞癌由来細胞OSC-19及び悪性黒色腫細胞A375、線維芽細胞として胎児肺由来線維芽細胞HELを使用した。各細胞から抽出したRNA、1検体につき10µgを50% formamide、17.5% formalin含有2% MOPS、pH7.5に溶解し、65℃で10分間反応させた。これを1% アガロースで2% MOPS中で電気泳動を行った。泳動後のゲルを、ナイロンメンブレン (例えば、Hybond-N, Amersham) に転写した。転写後のメンブレンを波長254 nmの紫外線を1200マイクロジュール照射し、固定した。このプロットを前項(a)と同じく³²P標識

(21)

特開平9-84589

39

したcDNAと16時間ハイブリダイゼーションを行い、パイオイメージアナライザーBAS1000(富士写真フイルム株式会社)でトレースし、シグナルの検出、強度を評価した。MT-MMP-3 mRNAは、T24細胞及びHe p2細胞で他の細胞より高い発現が検出されたが、これらの細胞におけるMT-MMP-1 mRNAの発現レベルは低レベルであった。一方、MT-MMP-1 mRNAの顕著な発現を認めたOSC-19細胞及びHEL細胞では逆にMT-MMP-3 mRNAの発現は他の細胞に比べ低レベルであった(図6B)。MT-MMP-1及びMT-MMP-3は、そのアミノ酸配列の比較から極めて類似したドメイン構造を有し、またプロMMP-2の活性化という同じ作用を有しているにも拘らず(実施例6参照)、その発現は、組織あるいは細胞レベルでは全く異なるパターンを示した。このことは、MT-MMP-1とMT-MMP-3が類似した構造及び作用を有するにも拘らず、異なる発現制御を受けていることを示している。

【0074】実施例3 モノクローナル抗体の調製

(a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表の配列番号: 2に記載したMT-MMP-3のアミノ酸配列中より他のMMPファミリーとの相同性が低い、MT-MMP-3に特徴的な配列として、次の4個の配列を選択し、合成した。

【0075】[配列番号: 5]

QTRGSSKFHIRRKR

(配列表配列番号: 2のGln¹⁰⁶ ~ Arg¹¹⁹の配列; 「ポリペプチドA」と略記する)

[配列番号: 6]

EEVPYSELENGKRD

(配列表配列番号: 2のGlu¹⁶⁸ ~ Asp¹⁸¹の配列; 「ポリペプチドB」と略記する)

[配列番号: 7]

PTSPRMSVVRSAETMQSA

(配列表配列番号: 2のPro⁵⁵ ~ Ala⁷²の配列; 「ポリペプチドC」と略記する)

[配列番号: 8]

TLGNPNHDGNDLFL

(配列表配列番号: 2のThr²²⁹ ~ Leu²⁴²の配列; 「ポリペプチドD」と略記する)

【0076】これらのポリペプチドをペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600、MilliGen/Bioserch)を使用して、Fmoc-bop法で合成した。ポリペプチドのN末端にはシステインを導入した。合成したペプチドはμBondasphere、C18カラム(Waters)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

【0077】(b) 各ポリペプチドとBSAの複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン(BSA)

40

と結合させ抗原コンジュゲートとした。20mg BSAを2mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解したものと18.13mg N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimideを200μlのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30分間反応させた。ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10(Pharmacia)でゲルろ過した。マレイミドが結合したBSAを分取し、1.5ml以下に濃縮した。マレイミドが結合したBSAに対し50倍モル量の前記(a)で合成した各ポリペプチドを1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものとそれぞれ混合し、4℃、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製した。

【0078】(c) 抗体産生細胞の調製

前記(b)で調製した4種類のポリペプチドA、B、C及びDとBSAとの複合体それぞれ200μgを完全フロインドアジュバントと共に8週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日後に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各複合体200μgをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複合体100μgを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

【0079】(d) 細胞融合

(1) 以下の材料および方法を用いた。

RPMI-1640培地: RPMI-1640(Flow Lab.)に重炭酸ナトリウム(24mM)、ビルビン酸ナトリウム(1mM)、ペニシリンGカリウム(50U/ml)、硫酸アミカシン(100μg/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2μm東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過した。

NS-1培地: 上記RPMI-1640培地に除菌ろ過したFCS(M. A. Bioproducts)を15%(v/v)の濃度になるように加えた。

PEG4000溶液: RPMI-1640培地にポリエチレングリコール4000(PEG 4000, Merck & Co.)を50%(w/w)になるように加え、無血清溶液を調製した。8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/O-Ag14)との融合は、Selected Method in Cellular Immunology pp351~372(ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi)、W. H. Freeman and Company(1980)に記載のOiらの方法を若干改変して行った。

【0080】(2) 以下では、ポリペプチドA-BSA複合体で免疫したマウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合に関して詳述する。前記(c)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)それぞれとミエ

(22)

特開平9-84589

41

ローマ細胞（生細胞率100%）とを5:1の比率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI1640培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞 1.1×10^5 個とミエローマ細胞 2.1×10^5 個を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に37℃に加温したPEG4000溶液〔50%（w/v）ポリエチレングリコール4000含有RPMI1640培地〕7.1mlを1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃に加温したRPMI1640培地14.2mlを2分間で滴下した後、同培地49.7mlを2~3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次にこの沈殿した細胞に37℃に加温したNS-1培地〔除菌ろ過した15%（w/v）仔牛胎児血清（JRH Biosciences）含有RPMI1640培地〕71mlを速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピペティングで分散した。さらに同培地142mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェルにウェル当り 6.0×10^5 個/0.1mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空气中で温度37℃、湿度100%で培養した。ポリペプチドB-BSA複合体で免疫したマウス由来脾細胞の場合では、脾細胞 6.2×10^5 個とミエローマ細胞 1.24×10^5 個を混合し、上記で使

【0081】（e）選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

（1）使用する培地は以下の通りである。

HAT培地：前記（d）（1）で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン（100μM）、アミノプテリン（0.4μM）およびチミジン（16μM）を加えた。
HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT培地と同一組成のものである。

（2）前記（d）の培養開始後翌日（1日目）、細胞にパスツールピペットでHAT培地2滴（約0.1ml）を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分（約0.1ml）を新しいHAT培地で置き換え、11日目に培地

42

の半分を新しいHT培地で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法（ELISA）により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン性96穴プレートを抗原としたポリペプチドA、B、CおよびDそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS（0.05%Tween20含有）を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン（Cappel Lab.）を加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機（MRP-A4、東ソー）を用いて492nmの吸光度で測定した。

【0082】（f）ハイブリドーマのクローニング

上記（e）で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化した。すなわち、NS-1培地1ml当りフィーダーとして 10^7 個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当り5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1mlのNS-1培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について（e）に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1~表4にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドB、ポリペプチドCまたはポリペプチドDに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ7個、16個、11個、4個得られた。

【0083】（g）ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清から濃度10~100μg/mlのモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマ 10^7 個を予め1週間前にプリスタンで腹腔内投与したマウス（BALB/c系、♀、6週齢）に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル（Bio-Rad）に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液（pH5）で溶出することにより精製した。

（h）モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

40

50

(23)

特開平9-84589

43

前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドB、ポリペプチドCまたはポリペプチドDをコートしたマイクロタイトレーションプレートに、(f)で得られたモノクローンの上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定した。最終的に表1～

表4に示したようにMT-MMP-3に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。

【0084】

【表1】

表 1

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
A	116-1E7	$\gamma 1/\kappa$
	116-2G6	$\gamma 1/\kappa$
	116-6A11	$\gamma 1/\kappa$
	116-7B2	μ/κ
	116-10E10	μ/κ
	116-11B2	μ/κ
	116-12E3	μ/κ

【0085】

【表2】

表 2

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
B	117-1F6	$\gamma 1/\kappa$
	117-2H5	$\gamma 1/\kappa$
	117-3B9	$\gamma 1/\kappa$
	117-4E1	$\gamma 1/\kappa$
	117-5A6	$\gamma 1/\kappa$
	117-6C11	$\gamma 1/\kappa$
	117-9H5	$\gamma 1/\kappa$
	117-10C6	$\gamma 1/\kappa$
	117-13B6	$\gamma 2a/\kappa$
	117-14E3	$\gamma 1/\kappa$
	117-15C5	$\gamma 1/\kappa$
	117-16E10	$\gamma 1/\kappa$
	117-17E10	$\gamma 2b/\kappa$
	117-18D9	$\gamma 1/\kappa$
	117-19D1	$\gamma 1/\kappa$
	117-20B3	$\gamma 1/\kappa$

【0086】

【表3】

44

表 3

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
C	157-3G4	$\gamma 1/\kappa$
	157-4A5	$\gamma 2b/\kappa$
	157-6F5	$\gamma 1/\kappa$
	157-11E1	μ/κ

【0087】

【表4】

表 4

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
D	158-2D6	$\gamma 2a/\kappa$
	158-3E12	$\gamma 2a/\kappa$
	158-8E6	$\gamma 1/\kappa$
	158-9F6	$\gamma 2b/\kappa$
	158-11D10	μ/κ
	158-16F12	$\gamma 1/\kappa$
	158-17F1	$\gamma 1/\kappa$
	158-18D8	$\gamma 1/\kappa$
	158-19F10	$\gamma 1/\kappa$
	158-20D5	$\gamma 2a/\kappa$
	158-21F11	$\gamma 1/\kappa$

なお、クローン番号 117-4E1は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5572として寄託保存されている(平成7年7月5日(原寄託日)に寄託された微工研菌寄第P-15031号(原寄託)よりブダベスト条約に基づく寄託への移管請求が平成8年7月1日にされた)。

【0088】(i)抗MT-MMP-3モノクローナル抗体の特異性

30 ヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(Clin. Chim. Acta, 219:1~14, 1993)、潜在型MMP-2(Clin. Chim. Acta, 221:91~103, 1993)及び潜在型MMP-3(Clin. Chim. Acta, 211:59~72, 1992)、ヒト直腸癌細胞(CaR-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(Cancer Res., 50:7758~7764, 1990)、ヒト好中球より精製した潜在型MMP-8(Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371:Supplement 295~304, 1990)並びにヒト線維芽細胞腫株(HT1080)の培養上清から精製した潜在型MMP-9(J. Biol. Chem., 267:21712~21719, 1992)をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載した固相-抗体結合テスト法(ELISA)によりヒトMT-MMP-3ペプチドと陽性反応を示す抗MT-MMP-3モノクローナル抗体(モノクローン番号117-4E1、157-6F5及び158-8E6)の交差反応性を調べた。すな

50 わち、ポリスチレン製96穴プレートを使用し、各ウェ

(24)

45

ルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8及びMMP-9をそれぞれ50 ng/wellで加えコートした。洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウェルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロックした。この各ウェルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体それぞれを1 µg/wellで加え、室温で約1時間静置した。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で約1時間反応させた。次に基質である過酸化水素とオフェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492 nmの吸光度で測定した。その結果、抗MT-MMP-3モノクローナル抗体は何れも、供試したMT-MMP-3以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。本実施例3の方法を、合成ペプチド抗原の代わりにリコンビナントMT-MMP-3、例えば下記実施例4あるいは5の方法で得られたリコンビナントMT-MMP-3を抗原として用いることにより繰り返し、同様にして抗MT-MMP-3モノクローナル抗体を作製する。

【0089】**実施例4** 遺伝子産物の発現と同定動物細胞を宿主としてMT-MMP-3を発現させるため、cDNAを発現ベクターと連結した。本実施例では、発現用ベクターにはSV40のプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナル、small T antigen遺伝子の介在配列を含むpSG5 (Stratagene)を用いた。実施例1(e)で構築したMT-MMP-3遺伝子をクローン化した組換えpBluescriptTM (Stratagene)からEcoRI切断により2.1 kbの挿入断片を切り出し、真核細胞用発現ベクターpSG5のEcoRIサイトにクローニングし、発現用プラスミドpSGMT2を作製した。ライゲーション反応は、ライゲーションキットに添付のプロトコールに従って行った。5%ウシ胎児血清及び2 mM glutamineを含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM)中で培養したアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にpSGMT2及びpSGT1 (TIMP-1 cDNAをpSG5にクローニングしてあるもの)をリン酸カルシウム法によりコ

20

30

40

50

特開平9-84589

46

た後、CO₂ インキュベーター中で約24時間インキュベートした。次に培地を除き、細胞をPBSで洗浄後、30 µCi/mlの³⁵S-メチオニンを含む新鮮なメチオニン不含DMEMを加えた。培養を5時間継続し、細胞タンパク質を³⁵Sで標識した。

【0090】遠心分離により細胞とコンディション培地を分離し、細胞を溶解緩衝液(0.15 M NaCl、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM Triton X-100、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 含有10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.5)中で4℃、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清及びコンディション培地を実施例3で得られた抗MT-MMP-3ポリペプチド抗体clone Nos. 117-4E1あるいは117-13B6、また対照として抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7と4℃、16時間反応させた。clone Nos. 117-4E1あるいは117-13B6抗体は、抗MT-MMP-3モノクローナル抗体の中でも非特異的反応性の低いものとして選択した。これらの抗原-抗体複合体にプロテインAをカップリングさせたセファロース-4B (Pharmacia)を加え、4℃で2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、細胞溶解液で3回洗浄し、最後に0.05 M Tris-HCl緩衝液、pH 6.8で洗浄した。この洗浄したセファロース-4BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液(10% glycerol、2% SDS、2% β-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue含有50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 6.5)を加え、100℃で3分間加熱した後、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。バイオイメージアナライザーBAS 1000 (富士写真フイルム株式会社)を用いて泳動後のゲルのシグナルの検出を行い、その結果を図7に示した。

【0091】使用した抗MT-MMP-3ポリペプチド抗体clone Nos. 117-4E1及び117-13B6はいずれも、MT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションした細胞のセルライゼート中の分子量64 kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP-3遺伝子を含まないベクターpSG5単独をトランスフェクトした細胞では、何れの抗体でも分子量64 kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量64 kDaは、配列表配列番号: 2に記載したアミノ酸配列から算出される分子量とほぼ一致した。また、分子量30、33及び

(25)

47

52 kDaに相当する3本のバンドがMT-MMP-3遺伝子をトランスフェクションした細胞のセルライゼート中から検出されたが、対照ではこれらのバンドは検出されなかった。一方、セルライゼートから免疫沈降されたこれらタンパク質は、コンディション培地中からは検出されなかった。これに対し、TIMP-1は分泌タンパク質であるが、実際、発現したTIMP-1は、その殆どがコンディション培地中に検出され、確かに細胞外に分泌されていることが確認された。以上の結果は、MT-MMP-3は、そのアミノ酸配列からシグナルペプチドの存在が示唆されるにも拘らず、容易に分泌されないことを示している。この知見は、MT-MMP-1が細胞表層上で発現し培地中では検出できなかった先の本発明者らの知見(Nature, 370:61~65, 1994)と非常によく類似している。MT-MMP-3 cDNAは、mRNAから逆転写酵素により合成された完全長のcDNAであるので、このcDNAを適当な発現ベクターに移すことで、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等を宿主としてMT-MMP-3を大量生産できる。pSGMT2をCOS-1に導入した本実施例では、MT-MMP-3の産生は短期的(transient expression)であるが、適当な選択マーカー(neo遺伝子、dehydrofolate reductase遺伝子等)を有する発現ベクターを使用し、CHO細胞等に導入することにより長期間生産可能な細胞株を得ることもできる。

【0092】実施例5 MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列の機能

(a) MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質(TIMP/MT-3)及びMT-MMP-1のC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質(TIMP/MT-1)の調製

MT-MMPsのC末端疎水性アミノ酸連続配列とTIMP-1とのキメラタンパク質の調製は、CaoらのMT-MMP-1のトランスメンブレンドメインとTIMP-1とのキメラタンパク質の調製法(J. Biol. Chem., 13:801~805, 1995)に準じて行った。MT-MMP-3のC末端疎水性アミノ酸連続配列を含むアミノ酸配列(Ala⁵⁵⁶~Val⁶⁰⁴)をコードするcDNA断片、あるいはMT-MMP-1のC末端疎水性アミノ酸連続配列を含むアミノ酸配列(Gly⁵³⁵~Val⁵⁸²)をコードするcDNA断片をPCRにより増幅し、断片を回収した。PCR増幅は、実施例1(b)と同様にして行った。得られたDNA断片それぞれをTIMP-1 cDNAの3'末端側に連結し、pSG5にサブクローニングすることによりTIMP-1/MT-3キメラタンパク質発現プラスミドpSGTIM2及びTIMP-1/MT-1キメラタンパク質発現プラスミドpSGTIM1を作製した。ライ

48

特開平9-84589

ゲーション反応は、ライゲーションキットに添付のプロトコールに従って行った。これらのプラスミドのCOS-1へのトランスフェクションは実施例4に記載と同様に行った。5%ウシ胎児血清及び2mM glutamineを含むDMEM中で培養したCOS-1にpSGTIM2、pSGTIM1あるいはpSGTIM1それぞれをリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。対照として、pSG5単独でCOS-1をトランスフェクションした。すなわち、2μgのプラスミドDNAに、60μlの0.25M CaCl₂を加え、次に2×BBS溶液(2.8mM Na₂HPO₄及び280mM NaCl含有50mM BES緩衝液、pH7.9)62.5μlをチューブの底に加えた。これを混合後、室温で30分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿をピペッティングにより分散し、COS-1細胞に滴下した後、CO₂インキュベーター中で約24時間インキュベートした。次に培地を除き、細胞をPBSで洗浄後、³⁵S-メチオニンを含む新鮮なメチオニン不含DMEMを加えた。培養を5時間継続し、細胞タンパク質を³⁵Sで標識した。

【0093】遠心分離により細胞とコンディション培地を分離し、細胞は溶解緩衝液(0.15M NaCl、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM Triton X-100、1% NP-40、1mMEDTA、1mM PMSF含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)中で4℃、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清及びコンディション培地を実施例3で得られた抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7と4℃で16時間反応させた。得られた抗原-抗体複合体にプロテインAをカップリングさせたセファロース-4B(Pharmacia)を加え、4℃で2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、細胞溶解液で3回洗浄し、最後に0.05M Tris-HCl緩衝液、pH6.8で洗浄した。この洗浄したセファロース-4BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液(10% glycerol、2% SDS、2% β-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH6.5)を加え、100℃で3分間加熱した後、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。バイオイメージアナライザーBAS1000(富士写真フイルム株式会社)を用いて泳動後のゲルのシグナルの検出を行った。TIMP-1、TIMP-1/MT-1、TIMP-1/MT-3はセルライゼート中で、それぞれ28、32、32kDaのタンパク質として検出された。検出されたキメラタンパク質TIMP-1/

(26)

49

MT-1及びTIMP-1/MT-3の分子量は、融合遺伝子から推定される分子量と合致した。TIMP-1は、セルライゼート中でも検出されたが、その大半はコンディション培地中に検出された。一方、TIMP-1/MT-1は、セルライゼート中からのみ検出され、コンディション培地中からは検出されなかった(J. Biol. Chem., 13:801~805, 1995)。これに対し、TIMP-1/MT-3はTIMP-1/MT-1と同様セルライゼート中のみ検出され、全く同じ局在を示した(図8)。これらの結果は、MT-MMP-3のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列がMT-MMP-1のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列と同様に融合タンパク質の細胞外への分泌を抑制していることを示している。

【0094】(b)細胞表層でのキメラタンパク質の発現

MT-MMP-3のC末端領域の疎水性アミノ酸連続配列が実際にトランスメンブレンドメインとして機能しているかどうかを、TIMP-1/MT-3発現細胞の間接蛍光免疫染色により検討した。COS-1にpSGT1あるいはpSGT1M2を実施例4に記載の方法と同様にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。但し、本実施例では、アイソトープラベルした培地は使用せず、細胞はスライドチャンバー上で培養した。培養24時間後、細胞を $5\mu\text{g/ml}$ の抗TIMP-1抗体clone No. 50-1H7、3%BSA含有PBS中で 37°C で40分間反応させた。次に細胞を3%

BSA含有PBSで3回洗浄し、風乾後、95%アセトンで5分間固定した。続いて細胞を3%BSA含有PBSに浸し、1500倍に希釈したfluorescent isothiocyanate (FITC) 標識ゴート抗(マウスIgG) IgG (Capel)と 37°C で30分間反応させた後、ふたたび3%BSA含有PBSで過剰な抗体を洗浄した。最後にglycerinを重層し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、pSGT1M2を発現している細胞(キメラタンパク質TIMP-1/MT-3を発現している細胞)では、細胞表面に蛍光が観察され、キメラタンパク質のTIMP-1部分が細胞表層上で発現していることが確認された。一方pSGT1を発現している細胞(キメラでないTIMP-1を発現している細胞)では蛍光は観察されず、細胞表層でのTIMP-1の発現は認められなかった(図9)。この結果は、MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを示している。

【0095】実施例6 MT-MMP-3の発現による潜在型MMP-2の活性化

実施例4で作製したMT-MMP-3 cDNAをクローン化したプラスミドpSG5M2あるいはMT-MMP-1 cDNAをクローン化したプラスミドpSG5M1

50

特開平9-84589

あるいはベクターpSG5それぞれと、潜在型MMP-2をクローン化したプラスミドpSGGAを、実施例4に記載したリン酸カルシウム法によりCOS-1にコトランスフェクションした。ただし、³⁵S-メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。また、ヒト線維芽細胞腫株HT1080に、pSGT1あるいはpSGT2あるいはpSG5それぞれと、pSGM2を、同様にコトランスフェクションした。HT1080は、潜在型MMP-2及び潜在型MMP-9を構成的に分泌しており(図10中の68kDa及び97.4kDaのバンドにそれぞれ相当)、また、MT-MMP-3 cDNAをトランスフェクションした細胞では、MT-MMP-3が発現していることを免疫沈降実験により確認した(実施例4参照)。得られたトランスフェクタントを無血清DMEM中で24時間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィーにかけた。培養上清をSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液(非還元; 10% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH6.5)と混和後 37°C で20分間インキュベートした後、0.1% gelatin含有10%ポリアクリルアミドゲルを用い、電流20mA、 4°C で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを2.5% Triton X-100溶液中で1時間ゆっくり振盪しながら洗浄し、次にゼラチナーゼ用緩衝液(10mM CaCl_2 , 0.15M NaCl, 0.02% NaN_3 含有50mM Tris-HCl, pH7.6)中で 37°C で24時間ゆっくり振盪させながらインキュベートした。緩衝液を廃棄し、ゲルを0.1% coomassie brilliant blue R250(50%メタノール-10%酢酸に溶解)で1時間染色後、脱色液(5%メタノール-7.5%酢酸)に浸し脱色した。得られたザイモグラフィーの結果を図10に示した。

【0096】MT-MMP-3 cDNAをトランスフェクションしたCOS-1では、MT-MMP-1 cDNAをトランスフェクションしたCOS-1と同様に、新たにそれぞれ活性中間体MMP-2と活性型MMP-2に相当する64kDaと62kDaのバンドが出現し、潜在型MMP-2の活性化が確認された。一方、ベクターpSG5をトランスフェクションした細胞では、潜在型MMP-2の68kDaのバンドのみが検出され、活性化に伴う分子量変化は観察されなかった(図10A)。COS-1細胞では、潜在型MMP-2発現プラスミド(pSGGA)をコトランスフェクションし、発現プラスミド由来の潜在型MMP-2の活性化を観察したが、潜在型MMP-2を構成的に発現するHT1080でも同様に、MT-MMP-3の発現に伴う潜在型MMP-2の活性化が観察された。このHT1080で観察された活性型MMP-2は、細胞を $100\mu\text{g/ml}$ のコ

(27)

特開平9-84589

51

ンカナバリンAで処理して誘導される活性型MMP-2分子と同じ分子量を示し、また抗MMP-2モノクローナル抗体と特異的に反応した。この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型MMP-9は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認めらず、活性化は認められなかった。TIMP-1とMT-MMP-3、あるいはTIMP-2とMT-MMP-3をコトランスフェクションした細胞における潜在型MMP-2の活性化は、何れも抑制された。その抑制の程度はTIMP-2をコトランスフェクションした細胞の方が、TIMP-1の場合よりも顕著であり、この傾向はMT-MMP-1、MT-MMP-3とも同様であった(図10B)。

【0097】本発明の態様のうちには、(A) MT-MMP-3又はその塩を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを抗原として用い、それに対する抗体を得ることを特徴とするMT-MMP-3を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質に対する抗体の製造方法；(B) MT-MMP-3を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質に対する抗体；(C) 抗血清であることを特徴とする上記(B)項記載の抗体；(D) モノクローナル抗体であることを特徴とする上記(B)項記載の抗体；(E) MT-MMP-3又はその塩に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記

(B)項又は(D)項記載の抗体；(F) MT-MMP-3又はその塩を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドまたはその塩で免疫した動物から得られたMT-MMP-3を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質に対する抗体を産生する細胞を、継代培養可能な細胞と融合せしめ、継代培養可能でかつMT-MMP-3を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質に対する抗体を産生するハイブリッド細胞を選別することを特徴とする上記(D)項又は(E)項記載の抗体の産生方法；(G) 特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドあるいはその塩を試薬として用いるか、あるいは上記

(B)～(E)のいずれか一記載の抗体を試薬として用いることを特徴とするMT-MMP-3の検出・測定方法；(H) 上記(G)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3に対する*

配列

```

GGCTCCTTAC CCACCCGGAG ACTTTTTTTT GAAAGGAAAC TAGGGAGGGA GGGAGAGGGA    60
GAGAGGGAGA AAACGAAGGG GAGCTCGTCC ATCCATTGAA GCACAGTTCA CT ATG      115
                                         Met
                                         1
ATC TTA CTC ACA TTC AGC ACT GGA AGA CGG TTG GAT TTC GTG CAT CAT      163

```

52

* 抗体；(I) 上記(G)項のMT-MMP-3の検出・測定方法に用いる標識化されたMT-MMP-3又はその塩あるいはその部分ペプチド又はその塩を包含する特許請求の範囲に記載の請求項1～6のいずれか一記載の標識化されたタンパク質あるいはその部分ペプチド又はその塩；(J) MT-MMP-3発現細胞あるいは発現組織の検出・測定方法に用いる標識化された特許請求の範囲に記載の請求項8～10のいずれか一記載の核酸；及び(K) ハイブリダイゼーション・プローブであることを特徴とする上記(J)項記載の核酸なども含まれてよい。

【0098】

【発明の効果】潜在型MMP-2の活性化能を有するMMPの一種であり且つMT-MMP-1以外の潜在型MMP-2活性化因子である天然のMT-MMPと実質的に同等な活性を有するタンパク質またはその塩を得ることができ、さらにそのタンパク質をコードする核酸が得られたことで、癌細胞の有無、癌の悪性度の診断等の癌の診断治療に関わる研究に有用な診断手段が得られることになった。またその他の医学的生理学的用途に有用でもある。本発明は特にヒト癌細胞表層で特異的に発現している新規マトリックスメタロプロテアーゼ、それをコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該マトリックスメタロプロテアーゼの製造方法、該マトリックスメタロプロテアーゼタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、さらにはそれらタンパク質及び抗体の用途がそれぞれ提供され、癌の診断、悪性度の判定マーカー及び癌などに対する抗転移薬剤の標的として、細胞表層で特異的に発現しているマトリックスメタロプロテアーゼを研究することが可能となった。アルツハイマー病の研究にも資することが可能となった。本発明により、有効な検知診断手段が提供される。

【0099】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：2107

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

(28)

特開平9-84589

53		54
Ile Leu Leu Thr Phe Ser Thr Gly Arg Arg Leu Asp Phe Val His His		
5	10	15
TCG GGC GTC TTT TTC TTG CAA ACC TTG CTT TGG ATT TTA TGT GCT ACA	211	
Ser Gly Val Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Trp Ile Leu Cys Ala Thr		
20	25	30
GTC TGC GGA ACG GAG CAG TAT TTC AAT GTC GAG GTT TGG TTA CAA AAG	259	
Val Cys Gly Thr Glu Gln Tyr Phe Asn Val Glu Val Trp Leu Gln Lys		
35	40	45
TAC GGC TAC CTT CCA CCG ACT AGC CCC AGA ATG TCA GTC GTG CGC TCT	307	
Tyr Gly Tyr Leu Pro Pro Thr Ser Pro Arg Met Ser Val Val Arg Ser		
50	55	60
GCA GAG ACC ATG CAG TCT GCC CTA GCT GCC ATG CAG CAG TTC TAT GGC	355	
Ala Glu Thr Met Gln Ser Ala Leu Ala Ala Met Gln Gln Phe Tyr Gly		
70	75	80
ATT AAC ATG ACA GGA AAA GTG GAC AGA AAC ACA ATT GAC TGG ATG AAG	403	
Ile Asn Met Thr Gly Lys Val Asp Arg Asn Thr Ile Asp Trp Met Lys		
85	90	95
AAG CCC CGA TGC GGT GTA CCT GAC CAG ACA AGA GGT AGC TCC AAA TTT	451	
Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Gln Thr Arg Gly Ser Ser Lys Phe		
100	105	110
CAT ATT CGT CGA AAG CGA TAT GCA TTG ACA GGA CAG AAA TGG CAG CAC	499	
His Ile Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Gln His		
115	120	125
AAG CAC ATC ACT TAC AGT ATA AAG AAC GTA ACT CCA AAA GTA GGA GAC	547	
Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile Lys Asn Val Thr Pro Lys Val Gly Asp		
130	135	140
CCT GAG ACT CGT AAA GCT ATT CGC CGT GCC TTT GAT GTG TGG CAG AAT	595	
Pro Glu Thr Arg Lys Ala Ile Arg Arg Ala Phe Asp Val Trp Gln Asn		
150	155	160
GTA ACT CCT CTG ACA TTT GAA GAA GTT CCC TAC AGT GAA TTA GAA AAT	643	
Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr Ser Glu Leu Glu Asn		
165	170	175
GGC AAA CGT GAT GTG GAT ATA CCC ATT ATT TTT GCA TCT GGT TTC CAT	691	
Gly Lys Arg Asp Val Asp Ile Pro Ile Ile Phe Ala Ser Gly Phe His		
180	185	190
GGG GAC AGC TCT CCC TTT GAT GGA GAG GGA GGA TTT TTG GCA CAT GCC	739	
Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala		
195	200	205
TAC TTC CCT GGA CCA GGA ATT GGA GGA GAT ACC CAT TTT GAC TCA GAT	787	
Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp		
210	215	220
GAG CCA TGG ACA CTA GGA AAT CCT AAT CAT GAT GGA AAT GAC TTA TTT	835	
Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Pro Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe		
230	235	240
CTT GTA GCA GTC CAT GAA CTG GGA CAT GCT CTG GGA TTG GAG CAT TCC	883	
Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser		
245	250	255
AAT GAC CCC ACT GCC ATC ATG GCT CCA TTT TAC CAG TAC ATG GAA CAG	931	
Asn Asp Pro Thr Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Gln		
260	265	270

(29)		特開平9—84589
55	56	
ACA CTT CAA CTA CCT AAT GAT GAT TAC AGG CAT CAG AGA TAT ATG TCA	979	
Thr Leu Gln Leu Pro Asn Asp Asp Tyr Arg His Gln Arg Tyr Met Ser		
275 280 285		
CCT GAC AAG ATT CCT CCA CCT ACA AGA CCT CTA CCG ACA GTG CCC CCA	1027	
Pro Asp Lys Ile Pro Pro Pro Thr Arg Pro Leu Pro Thr Val Pro Pro		
290 295 300 305		
CAC CGC TCT ATT CCT CCG GCT GAC CCA AGG AAA AAT GAC AGG CCA AAA	1075	
His Arg Ser Ile Pro Pro Ala Asp Pro Arg Lys Asn Asp Arg Pro Lys		
310 315 320		
CCT CCT CGG CCT CCA ACC GGC AGA CCC TCC TAT CCC GGA GCC AAA CCC	1123	
Pro Pro Arg Pro Pro Thr Gly Arg Pro Ser Tyr Pro Gly Ala Lys Pro		
325 330 335		
AAC ATC TGT GAT GGG AAC TTT AAC ACT CTA GCT ATT CTT CGT CGT GAG	1171	
Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg Glu		
340 345 350		
ATG TTT GTT TTC AAG GAC CAG TGG TTT TGG CGA GTG AGA AAC AAC AGG	1219	
Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn Arg		
355 360 365		
GTG ATG GAT GGA TAC CCA ATG CAA ATT ACT TAC TTC TGG CGG GGC TTG	1267	
Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly Leu		
370 375 380 385		
CCT CCT AGT ATC GAT CCA GTT TAT GAA AAT AGC GAC GGG AAT TTT GTG	1315	
Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe Val		
390 395 400		
TTC TTT AAA GGT AAC AAA TAT TGG GTG TTC AAG GAT ACA ACT CTT CAA	1363	
Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu Gln		
405 410 415		
CCT GGT TAC CCT CAT GAC TTG ATA ACC CTT GGA AGT GGA ATT CCC CCT	1411	
Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Ser Gly Ile Pro Pro		
420 425 430		
CAT GGT ATT GAT TCA GCC ATT TGG TGG GAG GAC GTC GGG AAA ACC TAT	1459	
His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr Tyr		
435 440 445		
TTC TTC AAG GGA GAC AGA TAT TGG AGA TAT ACT GAA GAA ATG AAA ACA	1507	
Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys Thr		
450 455 460 465		
ATG GAC CCT GGC TAT CCC AAG CCA ATC ACA GTC TGG AAA GGG ATC CCT	1555	
Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro		
470 475 480		
GAA TCT CCT CAG GGA GCA TTT GTA CAC AAA GAA AAT GGC TTT ACG TAT	1603	
Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr Tyr		
485 490 495		
TTC TAC AAG GAA GGA GTA TTG GAA ATT CAA ACA ACC AGA TAC TCA AGG	1651	
Phe Tyr Lys Glu Gly Val Leu Glu Ile Gln Thr Thr Arg Tyr Ser Arg		
500 505 510		
CTA GAA CCT GGA CAT CCA AGA TCC ATC CTC AAG GAT TTA TCG GGC TGT	1699	
Leu Glu Pro Gly His Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Leu Ser Gly Cys		
515 520 525		
GAT GGA CCA ACA GAC AGA GTT AAA GAA GGA CAC AGC CCA CCA GAT GAT	1747	
Asp Gly Pro Thr Asp Arg Val Lys Glu Gly His Ser Pro Pro Asp Asp		

(30)

特開平9-84589

57			58
530	535	540	545
GTA GAC ATT GTC ATC AAA CTG GAC AAC ACA GCC AGC ACT GTG AAA GCC			1795
Val Asp Ile Val Ile Lys Leu Asp Asn Thr Ala Ser Thr Val Lys Ala			
	550	555	560
ATA GCT ATT GTC ATT CCC TGC ATC TTG GCC TTA TGC CTC CTT GTA TTG			1843
Ile Ala Ile Val Ile Pro Cys Ile Leu Ala Leu Cys Leu Leu Val Leu			
	565	570	575
GTT TAC ACT GTG TTC CAG TTC AAG AGG AAA GGA ACA CCC CGC CAC ATA			1891
Val Tyr Thr Val Phe Gln Phe Lys Arg Lys Gly Thr Pro Arg His Ile			
	580	585	590
CTG TAC TGT AAA CGC TCT ATG CAA GAG TGG CTG TGATGTAGGG TTTTCTTC			1944
Leu Tyr Cys Lys Arg Ser Met Gln Glu Trp Val			
	595	600	604
TTTCTTTCTT TTGCAGGACT TTGTGGAAC TTGAGATTCA AGACAAGACC TGTATGCTG			2004
TTTCCTAGCT AGGAGCAGGC TTGTGGCAGC CTGATTCGGG GCTGACCTTT CAAACCAGAG			2064
GGTTGCTTGG TCCTGCACAT GAGTGGAAAT ACACTCATGG GGA			2107

【0100】

* 配列の種類：タンパク質

【配列番号：2】

起源

配列の長さ：604

生物名：ヒト

配列の型：アミノ酸

*20

配列

Met	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Ser	Thr	Gly	Arg	Arg	Leu	Asp	Phe	Val	His
1				5				10					15		
His	Ser	Gly	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Thr	Leu	Leu	Trp	Ile	Leu	Cys	Ala
			20					25					30		
Thr	Val	Cys	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Asn	Val	Glu	Val	Trp	Leu	Gln
		35					40				45				
Lys	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Pro	Arg	Met	Ser	Val	Val	Arg
	50				55					60					
Ser	Ala	Glu	Thr	Met	Gln	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Met	Gln	Gln	Phe	Tyr
	65			70				75						80	
Gly	Ile	Asn	Met	Thr	Gly	Lys	Val	Asp	Arg	Asn	Thr	Ile	Asp	Trp	Met
			85					90					95		
Lys	Lys	Pro	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Asp	Gln	Thr	Arg	Gly	Ser	Ser	Lys
		100						105				110			
Phe	His	Ile	Arg	Arg	Lys	Arg	Tyr	Ala	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys	Trp	Gln
		115					120					125			
His	Lys	His	Ile	Thr	Tyr	Ser	Ile	Lys	Asn	Val	Thr	Pro	Lys	Val	Gly
	130					135					140				
Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Ala	Ile	Arg	Arg	Ala	Phe	Asp	Val	Trp	Gln
	145				150					155				160	
Asn	Val	Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Glu	Glu	Val	Pro	Tyr	Ser	Glu	Leu	Glu
			165					170				175			
Asn	Gly	Lys	Arg	Asp	Val	Asp	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Phe
		180					185					190			
His	Gly	Asp	Ser	Ser	Pro	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Gly	Phe	Leu	Ala	His
		195				200						205			
Ala	Tyr	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Ile	Gly	Gly	Asp	Thr	His	Phe	Asp	Ser
	210					215					220				
Asp	Glu	Pro	Trp	Thr	Leu	Gly	Asn	Pro	Asn	His	Asp	Gly	Asn	Asp	Leu

(31)

特開平9-84589

59 60
 225 230 235 240
 Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His
 245 250 255
 Ser Asn Asp Pro Thr Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu
 260 265 270
 Gln Thr Leu Gln Leu Pro Asn Asp Asp Tyr Arg His Gln Arg Tyr Met
 275 280 285
 Ser Pro Asp Lys Ile Pro Pro Pro Thr Arg Pro Leu Pro Thr Val Pro
 290 295 300
 Pro His Arg Ser Ile Pro Pro Ala Asp Pro Arg Lys Asn Asp Arg Pro
 305 310 315 320
 Lys Pro Pro Arg Pro Pro Thr Gly Arg Pro Ser Tyr Pro Gly Ala Lys
 325 330 335
 Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Leu Ala Ile Leu Arg Arg
 340 345 350
 Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Gln Trp Phe Trp Arg Val Arg Asn Asn
 355 360 365
 Arg Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Gln Ile Thr Tyr Phe Trp Arg Gly
 370 375 380
 Leu Pro Pro Ser Ile Asp Ala Val Tyr Glu Asn Ser Asp Gly Asn Phe
 375 390 395 400
 Val Phe Phe Lys Gly Asn Lys Tyr Trp Val Phe Lys Asp Thr Thr Leu
 405 410 415
 Gln Pro Gly Tyr Pro His Asp Leu Ile Thr Leu Gly Ser Gly Ile Pro
 420 425 430
 Pro His Gly Ile Asp Ser Ala Ile Trp Trp Glu Asp Val Gly Lys Thr
 435 440 445
 Tyr Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Met Lys
 450 455 460
 Thr Met Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile
 455 470 475 480
 Pro Glu Ser Pro Gln Gly Ala Phe Val His Lys Glu Asn Gly Phe Thr
 485 490 495
 Tyr Phe Tyr Lys Glu Gly Val Leu Glu Ile Gln Thr Thr Arg Tyr Ser
 500 505 510
 Arg Leu Glu Pro Gly His Pro Arg Ser Ile Leu Lys Asp Leu Ser Gly
 515 520 525
 Cys Asp Gly Pro Thr Asp Arg Val Lys Glu Gly His Ser Pro Pro Asp
 530 535 540
 Asp Val Asp Ile Val Ile Lys Leu Asp Asn Thr Ala Ser Thr Val Lys
 545 550 555 560
 Ala Ile Ala Ile Val Ile Pro Cys Ile Leu Ala Leu Cys Leu Leu Val
 565 570 575
 Leu Val Tyr Thr Val Phe Gln Phe Lys Arg Lys Gly Thr Pro Arg His
 580 585 590
 Ile Leu Tyr Cys Lys Arg Ser Met Gln Glu Trp Val
 595 600 604

【0101】

【配列番号：3】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50 トポロジー：直鎖状

(32)

特開平9-84589

61

62

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

SGNVVNGCWG AYATMRTSAT

20

【0102】

【配列番号：4】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

配列

YTCRTSNTCR TCRAARTGRR HRTCYYC

27

【0103】

【配列番号：5】

配列の長さ：14

10※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

配列

Gln Thr Arg Gly Ser Ser Lys Phe His Ile Arg Arg Lys Arg

1

5

10

14

【0104】

【配列番号：6】

配列の長さ：14

★配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：ペプチド

配列

Glu Glu Val Pro Tyr Ser Glu Leu Glu Asn Gly Lys Arg Asp

1

5

10

14

【0105】

【配列番号：7】

配列の長さ：18

☆配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：ペプチド

配列

Pro Thr Ser Pro Arg Met Ser Val Val Arg Ser Ala Glu Thr Met Gln

1

5

10

15

Ser Ala

18

【0106】

【配列番号：8】

配列の長さ：14

30◆配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Leu Gly Asn Pro Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu

1

5

10

14

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のMT-MMP-3のアミノ酸配列と既知のMMPファミリー（MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11及びMT-MMP-1）のアミノ酸配列との相同性を比較し、ドメイン構造を示した図である。アミノ酸の表記は一般的な一文字表記に従い、プレ型のN末端をアミノ酸1位として番号を付した。

【図2】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を比較した結果を図1に続けてアライメントとして示す。

【図3】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を比較した結果を図2に続けてアライメントとして示す。

【図4】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリー

ミリーのアミノ酸配列との相同性を比較した結果を図3に続けてアライメントとして示す。

【図5】本発明のMT-MMP-3と既知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を比較した結果を図4に続けてアライメントとして示す。

【図6】ノーザンブロット分析の結果の電気泳動写真を示す。

A：ノーザンブロット分析による各種ヒト組織中でのMT-MMP-3 mRNAの発現を調べた結果を示したものである。

B：ノーザンブロット分析による各種ヒト培養癌細胞中でのMT-MMP-3 mRNAの発現を調べた結果を示したものである。

【図7】MT-MMP-3 cDNAをCOS-1細胞中で発現させ、MT-MMP-3タンパク質を免疫沈殿法

50

(33)

特開平9-84589

63

によりセルライゼート及びコンディショニング培地中より検出した結果の電気泳動写真を示したものである。MT-MMP-3タンパク質(64kDa)、TIMP-1タンパク質(28kDa)の位置をそれぞれ▲、△で示した。

【図8】MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを、TIMP-1/疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を作製して検討した結果の電気泳動写真を示す。

A: 遺伝子工学的に作製した融合タンパク質をCOS-1細胞中で発現させ、セルライゼートとコンディショニング培地中より検出した結果を電気泳動写真で示したものである。

【図9】MT-MMP-3のC末端の疎水性アミノ酸の連続配列がトランスメンブレンドメインとして機能していることを、TIMP-1/疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を作製して検討した結果を生物の形態*

64

*を示す写真として示す。

B: COS-1細胞中で発現させたTIMP-1/疎水性アミノ酸の連続配列の融合タンパク質を免疫蛍光染色により検出した結果を生物の形態を示す写真で示したものである。

【図10】MT-MMP-3の発現による潜在型MMP-2の活性化の様子をザイモグラフィーの結果の電気泳動写真で示す。

A: MT-MMP-3 cDNA及び潜在型MMP-2 cDNAをコトランスフェクションしたCOS-1細胞中での潜在型MMP-2の活性化を示した電気泳動写真である。

B: MT-MMP-3 cDNAをトランスフェクションしたHT 1080細胞中での潜在型MMP-2の活性化及びこの潜在型MMP-2の活性化に及ぼすTIMP-1、TIMP-2の影響を示した電気泳動写真である。

【図5】

MMP-1	-----	469
MMP-2	-----	660
MMP-3	-----	477
MMP-7	-----	267
MMP-8	-----	468
MMP-9	-----	708
MMP-10	-----	476
MMP-11	-----	489
MMP-12	-----	470
MT-MMP-1	LLVLAVGLAVFFRRHGTPRRLLYCQRLDKV	582
MT-MMP-3	LCLLVLVYTVFQFKRKGTPRHILYCKRSMQEWV	604
Consensus	-----	833

[illegible]

(35)

【図 2】

Catalytic

MMP-1	I S F V R G D H R D N S P F D G P C G N L A H A F Q P G P G I G D A H F E D H E R W T N - N F E Y N -----
MMP-2	I N F R M E H G D G Y P F D K O G L L A H A F A P G T G V G D S H E D D E L M T L G S G V R V K Y G N A D G E Y C K F P F L F N G K E Y N S C T D T G R S D G F L M C S T T Y N F E K D G K -----
MMP-3	I S F A V R H G D E Y P F D G P G N V L A H A Y A P G T G I N G D A H F D D E Q W T K - D T T G T N -----
MMP-7	I G F A R G A H G D S Y P F D G P G N T L A H A F A P G T G I G G D A H F E D E R W T D G S S I L G I N -----
MMP-8	I A F Q R D H G D N S P F D G P N G I L A H A F Q P G G I G G D A H F D A E T W T N - T S A N Y N -----
MMP-9	I Q F V A E H G D Y P F D K O G L L A H A F P P G P G I G D A H F D D E L M S L G K G V V P F T R F G N A D G A A C H F P F I F E G R S Y S A C T T D G R S D G L P M C S T T A N Y D T D O R -----
MMP-10	I S F A V K E H G D F Y S F D G P G H S L A H A Y P G P G L Y C D I H F D D E K W T E - D A S C T N -----
MMP-11	I D F A R Y M G D D L P F D G P G G I L A H A F P K T H R E G O V H F D E T W T I T G D D G D T D -----
MMP-12	V W F A R G A H G D E H A F D G K G G I L A H A F P G S G I G G D A H F E D E F W T T - H S G G T N -----
MT--MMP-1	I F F A E G F H G D S T P F D G E G G F L A H A Y P G P N I G D T H F D S A E P W T V - R N E D L N -----
MT--MMP-3	I I F A S G F H G D S P F D G E G G F L A H A Y F P G P G I G D T H F D S E P W T I L G N P N H D G -----
Consensus	I . F A . . . H G D . . P F D G P G C . L A H A F . P G P G I G D A H F . D E . W T N -----
	Catalytic
MMP-1	Y G F C P H E A L F T M G G N A E G O C K P F P F Q G T S Y D S C T T E R T D G Y R M C G T T E Y D R D K K Y C F C P E T A M S T V - G G N S E G A P C V P F P F L G N K Y E S T C S A G R S -----
MMP-2	-----
MMP-3	-----
MMP-7	-----
MMP-8	-----
MMP-9	F G C P S E R L Y T R D G N A D G R C P P F I F Q G S Y S A C T T D G R S D G Y R M C A T T A N Y D R D K L F G C P T R A D S T Y M G G N S A G E L C V P F P F L G K E Y S T C T S E G R G -----
MMP-10	-----
MMP-11	-----
MMP-12	-----
MT--MMP-1	-----
MT--MMP-3	-----
Consensus	-----

(36)

特開平9-84589

【図4】

Hemopexin	
MMP-1	FTSVFNPQLPNCLEAAEFADRDVEVRFKGNKYAV--QGQNVLHGYPKDIYSFGFPRIVKHIDAA--LSEENTGKTYFFVANKYWRDEYKRSHMDPGYPK
MMP-2	LVATFNPDELPEKIDAVYEAPOEEKAVFFACNEWYIY--SASTLERGYPRLTS--LGLEPDVQVVDAA--FNMENKTKTYIFAGDKFMYNEVKKKMDPGFPK
MMP-3	LISFNPSPSGVDAAYEVTSKDLVIFKGNQFWAI--RGNEVRAGYPRGIHT--LGFPPTVRKIDAA--ISDKEKNKTYFFVEDKYWRFDKRNSEPCFPK
MMP-7	-----
MMP-8	FI SLFNP SLPTGICIAAYEDFDRDLIELFKGNQYHAL--SGYDILQGYPKDISN--YGFPSVVOAIDAA--VFYNS--KTYFFVNDQFWRYNQRFMEPGYPK
MMP-9	LIADKNPALPKLDSVFEELSKLFFSGQVNVYTGASVL--G-PRRLDK--LGIGADVAVQTGA--LRSGR--GKMLLFSGRLLWRFDVKAQVMDPRSAS
MMP-10	LISAFNP SLPSYLDAAEYNSRDTVIFKCNFMAI--RGNEVQAGYPRGIHT--LGFPPTIRKIDAA--VSDKEKKTYFFAADKYWRFDENSQMEQGFPR
MMP-11	LASRHMQLSPVDAAFE--DAQGHINWFQCAQYVY--DGERPVLG--PAPLTS--LGLVRRP--VHAALVNGPEKKIYFFRGDYWRFHSTRRVDSVPVR
MMP-12	LISSLMPTLPSGIEAAEIEARNOVFLFKDKKYLII--SNLRPEPNYPSIHS--FCGFNPVKKIDAA--VFNPFRYNTYFFVNDQYWRFDERQMDPGYPK
MT-MMP-1	PIGQFNRGLPASINTAYERNKCKFVF--FKCDKHVVF--DEASLEPGYPAHINS--LGRGLPTDKIDAA--LFWNPNGKTYFFRGKRYRFRNEEIRAVDSEYPK
MT-MMP-3	QIITYFNRGLPPIIDAVYENSQGNFVF--FKGNKYVVF--KOTYLPQGYPHLIT--LCSGIPPHGIDSA--IMWEDVCKTYFFKCDRYRFRSEEMKTDPGYPK
Consensus	LIS.FNP.LP...DAAYE.....VF.FKGN.YW.....GYP..I..-LG.P..V..IDAA.....NTYFF.....YNR.DE.....MDPG.PK
Hemopexin	
MMP-1	MIADFFPGIGHKVDVAVFMKDGFF--YFFHCTROVKFDPKT--KRILTJ--OKANS--WFCRKN
MMP-2	LIADANNAIPDNLDVAVDLQGGGHSYFFKCAVYLKLENS--LKSVPF--GSKSDNLGC
MMP-3	QIAEDFFGIDSKIDAVFEFGFF--YFFTGSSQLEFPNA--KKTHT--LKSNS--WLNC
MMP-7	-----
MMP-8	SISGAFPGIESKVDVAVFOQEHFF--HVFSGPRYAFDLIA--QRVTRV--ARGNK--VLNCRYG
MMP-9	EVDRMFPGVPLDTHDVFOYREKA--YFCQDRFYWRVSSRSELNOVQVYTYDILQCFED
MMP-10	LIADDFPGVPEKVDVAVLQAFGF--YFFSGSSQFEFPDPA--RVVTHI--LKSNS--WLHC
MMP-11	R-ATDWRGVPSEIDAAFOADGYA--YFLRGRLLYKDFVKA--VKALEGFRILVGPDPFFCCAEPAITFL
MMP-12	LITKNFQIGIPKIDAVFYSKNKY--YFFFGSNQFQYDFLL--QRITKT--LKSNS--WFGC
MT-MMP-1	NIKVWE--GIPESPRGSMGSEVFTFYKGNKYKFNQKLKVEPGYPKSALRDWGPCSGGRPDGTESETE--VIIIEVDEEGGAVSAAVLPVILL
MT-MMP-3	PITVWK--GIPESPOGAFVHKENGFTFYKHEGVLEIOTRYSRLPGHPSILKDLSCGCGPTDRVKECHSPDDVDIVIKLONTASTVKAIAIVIPCILA
Consensus	I....F.GI....DAVF.....YFF.G.....FD.....W..C

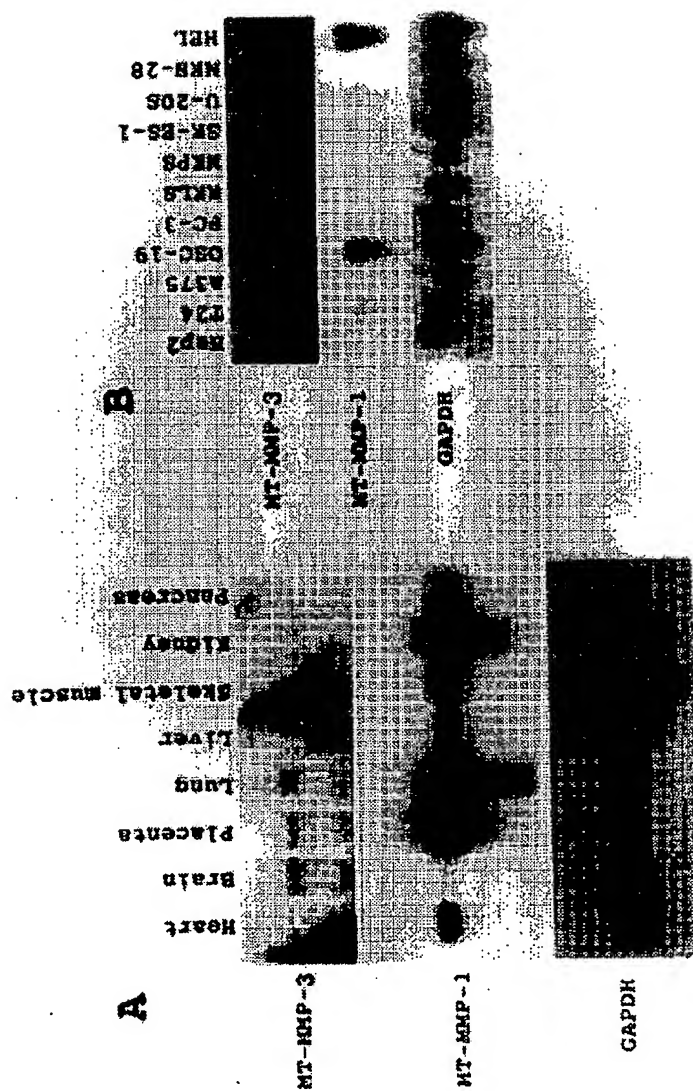
↑ IS-3

(37)

特開平9-84589

【図6】

図面代用写真

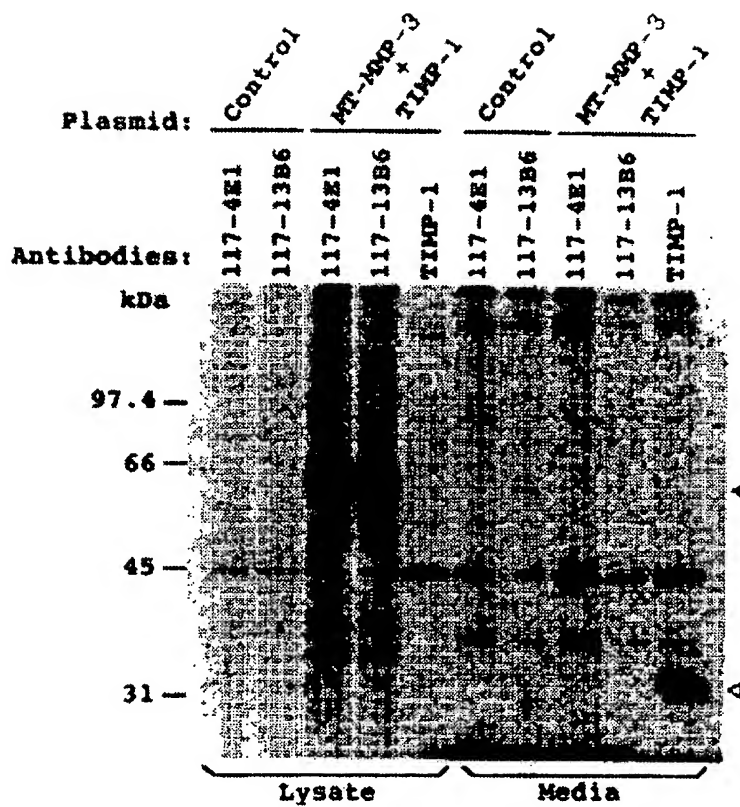


(38)

特開平9-84589

【図7】

図面代用写真

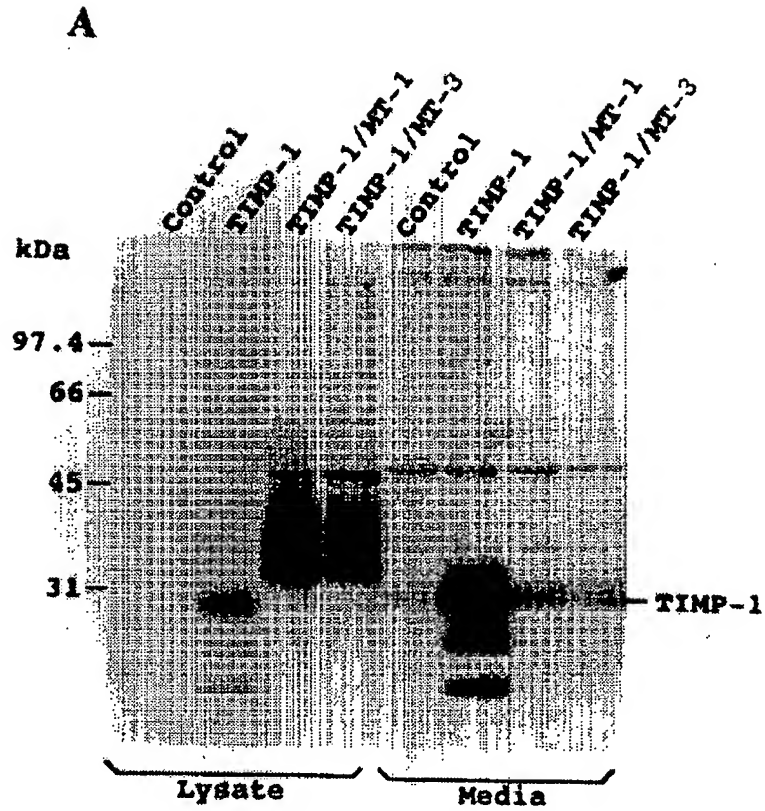


(39)

特開平9-84589

【図8】

図面代用写真

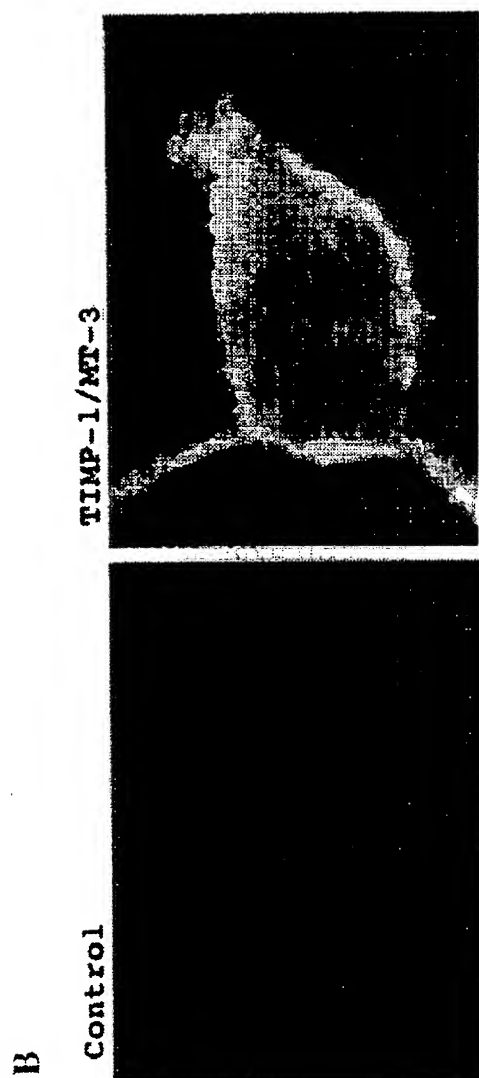


(40)

特開平9-84589

【図9】

写真用代用面図

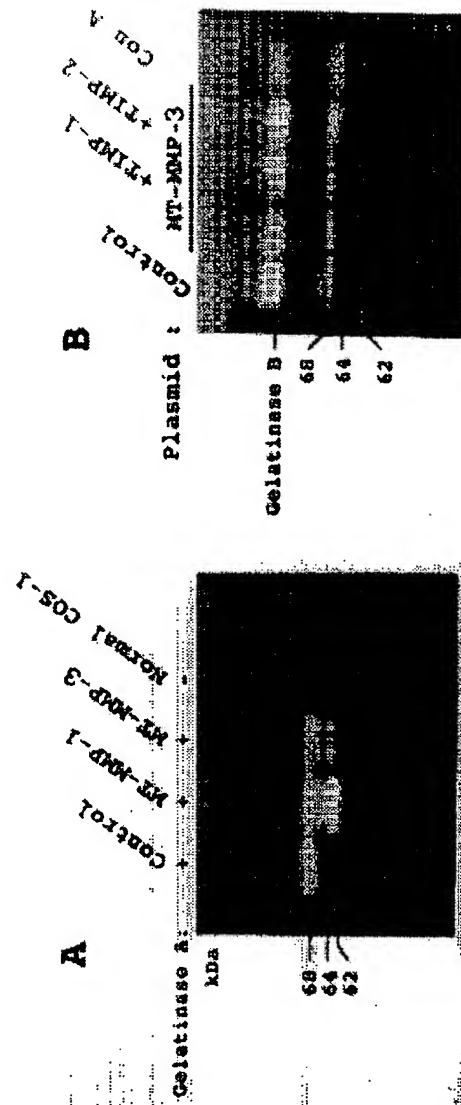


(41)

特開平9-84589

【図10】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

// A 6 1 K 38/46

C 0 7 K 16/40

C 1 2 P 21/08

(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 5/10

識別記号

A A M

庁内整理番号

Z N A

F I

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/00

A 6 1 K 37/54

技術表示箇所

B

A A M

(42)

特開平9－8 4 5 8 9

C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 N 9/64
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)



US 20010016333A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2001/0016333 A1****Seiki et al.**(43) **Pub. Date: Aug. 23, 2001**(54) **NOVEL PROTEIN AND MONOCLONAL
ANTIBODY SPECIFIC THERETO**

Jul. 14, 1995 (JP) 7-200320

Publication Classification(76) Inventors: **Motoharu Seiki, Shinagawa (JP);
Hiroshi Sato, Kanazawa (JP); Akira
Shinagawa, Takaoka (JP)**(51) **Int. Cl.⁷** **C12P 21/02; C12P 21/08;
C07H 21/04**(52) **U.S. Cl.** **435/69.1; 530/324; 435/70.1;
435/320.1; 536/23.5**

Correspondence Address:

**WENDEROTH, LIND & PONACK, L.L.P.
Suite 800****2033 "K" Street, N.W.
Washington, DC 20006 (US)**(57) **ABSTRACT**

A novel protein which is useful as diagnostic means for the studies relating to the diagnosis and treatment of cancer (detection of cancer cells, estimation of the malignity, etc.) and in other medicinal and physiological purposes; a gene encoding the same; and an antibody, in particular, a monoclonal antibody specific to the protein. MT-MMP-3, which is a pro MMP-2 activator having the ability to activate pro MMP-2 which is under expression specifically on the surface layer of a human cancer cell and falling within the category of MMP but being different from MT-MMP-1; a DNA containing the base sequence encoding the same; host cells transformed by the DNA; a process for producing a matrix metalloproteinase protein by using the host cells; a monoclonal antibody binding specifically to the matrix metalloproteinase protein; and use of the protein and antibody.

(21) Appl. No.: **09/734,002**(22) Filed: **Dec. 12, 2000****Related U.S. Application Data**

(62) Division of application No. 09/000,041, filed on Feb. 20, 1998, now Pat. No. 6,191,255, which is a 371 of international application No. PCT/JP96/01956, filed on Jul. 12, 1996.

(30) **Foreign Application Priority Data**

Jul. 14, 1995 (JP) 7-200319

FIG. 1A-I

	Signal peptide	
MMP-1	MHSFP L L L L F W G	V V S H S F P
MMP-2	M E A L M A R G A L T G P L R A L C L L G C L L S H A A	---A P---
MMP-3	M K S L P I L L L C V A V	---C S A Y P---
MMP-7	M R - L T V L C A V C L L	---P G S L A L P---
MMP-8	M F S L K T L P F L L L H	---V Q I S K A F P---
MMP-9	M S L W Q P L V L V L L G C C	---F A A P R Q R Q S T L V L F P G
MMP-10	M M H L A F L V L L C L P V	---C S A Y P---
MMP-11	M A P A A W L R S A A R A L L P M L L L L Q P P L L A R A L P	---
MMP-12	M K F L L I L L L Q - A T A	---S G A L P---
MT-MMP-1	M S P A P R P S R C L L L P L L T L G T A L A S L G S A Q S S F S P	---
MT-MMP-3	M I L L T F S T G R R L D F V H	---H S G V F F L Q T L L W I L C A T V C G
Consensus	M . . L . . L . . . LA.P.....
	Pro-peptide	
MMP-1	DAETLKVMKQPRCGVPDVAQ	---FVLTEGNPRWEQTHLT
MMP-2	DQNTIETMRKPRCGNPDVAN	---YNFFPRKP KWDKNQIT
MMP-3	DSDTLEVMRKPRCGVPDVGH	---FRFP GIPKWRKTHLT
MMP-7	NSRVIEIMQKPRCGVPDAE	---YSLFPNSPKWTSKVVT
MMP-8	NEETLDMKKKPRCGVPDSGG	---FMLTPGNPKWERTNLT
MMP-9	DSATLKAMRTPRCGVPDLGR	---FQTFEGDLKWHHNIT
MMP-10	DTDITLEVMRKPRCGVPDVGH	---FSSEFGMPKWRKTHLT
MMP-11	APRPASSLRPPRCGVPDPSD	---GLSARNRQRFVLSGG---
MMP-12	DTSTLEMHAPRCGVPDLHH	---FREMPPGVPVRKHYIT
MT-MMP-1	DADTMKAMRRPRCGVPDKFGAEI	KANVRRKRYAIQ-G-LKQHN
MT-MMP-3	DRNTIDWMKKKPRCGVPDQTRGSS	KFHIRRKRYALTGQ--KWQHKHIT
Consensus	D . . T L . . M R K P R C G V P DF...P G . P K W

↑IS-1

FIG. 1A-2

Pro-peptide

EQVDLVQKYLEKYNNLKNDRQVEKRRNSGPVV-EKLKQMQEFFGLKVTGKP 79
 DVAPK-TDKELAVQYINTF-YGCPKE-SCNLFVLKDTLKKMQKFFGLPQTGDL 89
 DTSMLVQKYLENYDLKKDVQFVRRKDSGPVV-KKIREMQKFLGLEVTGKL 79
 AGMSELQWEQAQDY-LKRFYLYDSETKNANSLE-AKLKEMQKFFGLPITGML 74
 EKNTKTVQDYLEKFYQLPSNQYQSTR-KNGTNVIVEKLEKEMQKFFGLNVTGKP 78
 DLRTNLTDRQLAEEYLYRYGYTRVAEMRGESKSLGPAALLLQKQLSLPETGEL 86
 DSNKDLAQQYLEKYNNLEKDVQFRRK-DSNLIV-KKIQQMQKFLGLEVTGKL 78
 -----PDVHHLHAERRGPQ-----PWHALPSSPAPAPATQE 67
 KNNVLFGERYLEKFYGLEINKLPVTMKYSGNLMKEKIQEMQHFLGLKVTGQL 79
 -----EAWLQQYGYLPPGDLRTHTQSPQSLS-AAIAAMQKFFGLQVTGKA 80
 TEQYFNVEVWLQKYGYLPPTSPRMSVVRSAETMQ-SALAAQQQFYGINMTGKV 88
L...Y.L.....-..KL..MQKF.GL.VTGKL 100

Catalytic

YRIENYTPDLPRAVDVDAIEKAFQLWSNVTPLTFTKV-----SEQQADIM 160
 YRIIGYTPDLDPETVDDAFARAFQVWSDVTPLRFSRI-----HDGEADIM 170
 YRIVNYTPDLPKDAVDSAVEKALKVWEVTPLTFSRL-----YEGEADIM 160
 YRIVSYTRDLPHTVDRLVSKALNMWGKEIPLHFRKV-----VWGTADIM 155
 YRIRNYTPQLSEAEVERAIKDAFELWSVASPLIFTRI-----SQGEADIM 159
 YWIQNYSEDLPRVIDDAFARAFALWSAVTPTFTTRV-----YSRDADIV 167
 YRIVNYTPDLPRAVDVDAIEKALKVWEVTPLTFSRL-----YEGEADIM 159
 YRILRFPWLQVQEVRQTMAEALKVWSDVTPLTFTTEV-----HEGRADIM 156
 YRINNYTPDMNREDVDYAIRKAFQVWSNVTPLKFSKI-----NTGMADIL 160
 FCIQNYTPKVGEYATYEAIRKAFRVWESATPLRFREVVPYAIRREGHEKQADIM 178
 YSIKNVTPKVGDPEPTRKAIIRRAFQVWQNVTPLTFTFEVVPYSELENGK-RDQVDIP 185
 YRI.NYTPDL....VD.AI.KAF.VWS.VTPTFT..V-----..G.ADIM 200

↑ IS-2

FIG. 1B-1

	Catalytic
MMP-1	ISFVRGDHRDNSPFDGPGGNLAHAFQPGPGIGGDAHFDEHERWTN-NFTEYN
MMP-2	INFGRWEHGDGYPFDGKDLAHLAFAFPGTCVGGDSHFDDDELWTLGEGQVVR
MMP-3	ISFAVREHGDYFPFDGPGNVLAHAYAPGPGINGDAHFDDDEQWTK-DTTGTN
MMP-7	IGFARGAHGDSYFPFDGPGNTLAHAFAPGTGLGGDAHFDEDERWTDGSSLGIN
MMP-8	IAFYQRDHGDNSPFDGPGNLAHAFQPGPGIGGDAHFDAEETWTN-TSANYN
MMP-9	IQFGVAEHGDSYFPFDGKDLAHLAFAFPGPGIQGDAHFDDDELWSLGKGVVP
MMP-10	ISFAVKEHGDYFPFDGPGHSLAHAYPPGPGLYCDIHFDDEKWTEDASGTN
MMP-11	IDFARYWDGDDLFPFDGPGIILAHAFPPKTHREGDVHFDDYDETWIGDDQGTD
MMP-12	VVFARGAHGDFHAFDGGKGIILAHAFPGPGSGIGGDAHFDEDEFWTT-HSGGTN
MT-MMP-1	IFFAEGFHGDSYFPFDGEGGFLAHAYFPNIGGDTHFDSAEPTV-RNEDLN
MT-MMP-3	IIIFASGFHGDSSPFDGEGGFLAHAYFPNIGGDTHFDSDEPTLGNPNHDG
Consensus	I.FA...HGD..PFDGPGG.LAHAF.PGPGIGGDAHF.DE.WT-.....N
	Catalytic
MMP-1	-----
MMP-2	YGFCPHEALFTMGNAEGQPCPFPRFQTSYDSCCTTEGRTDGYRWC GTTED
MMP-3	-----
MMP-7	-----
MMP-8	-----
MMP-9	FGFCPSERLYTRDGNADGKPCQPFIFQGSYSACTTDGRSDGYRWCATTAN
MMP-10	-----
MMP-11	-----
MMP-12	-----
MT-MMP-1	-----
MT-MMP-3	-----
Consensus	-----

FIG. 1B-2

211 VKYGNADGEYCKFPFLFNGKEYNSCTDTGRSDGFLWCSTTYNFEKDGK
270 -----
211 -----
207 -----
210 TRFGNADGAACHFPFIFEGRSYSACTTDGRSDGLPWCSTTANYDTDDR
267 -----
210 -----
208 -----
211 -----
229 -----
237 -----
300 -----

211 YDRDKKYGFCPETAMSTV-GGNSEGAPCVFPFTFLGNKYESCTSAGRS
369 -----
211 -----
207 -----
210 YDRDKLFGFCPTRADSTVMGGNSAGELCVFPFTFLGKEYSTCTSEGRG
367 -----
210 -----
208 -----
211 -----
229 -----
237 -----
400 -----

FIG. 1C-1

	Catalytic	Hinge
MMP-1	-----LHRVAA-HELGHSLGLSHST	-----RSQNP
MMP-2	DGKMWCATTANYDDDRKKGFCPDQGYSLFLVAA-HEFGHAMGLEHSQ	-----ASPDIDLGTG
MMP-3	-----LFLVAA-HEIGHSLGLEHSA	-----PPDSPETPLVPT
MMP-7	-----FLYAA-THLGHSLGMGHSS	-----LSSNP
MMP-8	-----LFLVAA-HEFGHSLGLAHSS	APPTVCPTGPTVHPSERPTAGTGPSSAGTGPPTAGPSTA-TTVP
MMP-9	DGRLWCATTSNFDSKKGFCPDQGYSLFLVAA-HEFGHALGLDHSS	-----PPPASTEELVPTK
MMP-10	-----LFLVAA-HELGHSLGLEHSA	-----QPWPTVTSRTPALGPQAGIDTNE
MMP-11	-----LLQVAA-HEFGHVLGLQHTT	-----DPKENQRL
MMP-12	-----LFLTAV-HEIGHSLGLGHSS	-----GESGFPTKMPPQPRTTSRPSVP
MT-MMP-1	-----GNDIFLVAV-HELGHALGLEHSS	-----SPDKIPPPTRPLPTVPPHRSIAPPADPRKNDRPKPPRPT
MT-MMP-3	-----NDLFLVAV-HELGHALGLEHNS	-----
Consensus	-----LFLVAA-HE.GHSLGL.HS.	-----
MMP-1		
MMP-2		
MMP-3		
MMP-7		
MMP-8		
MMP-9		
MMP-10		
MMP-11		
MMP-12		
MT-MMP-1		
MT-MMP-3		
Consensus		

FIG. IC-2

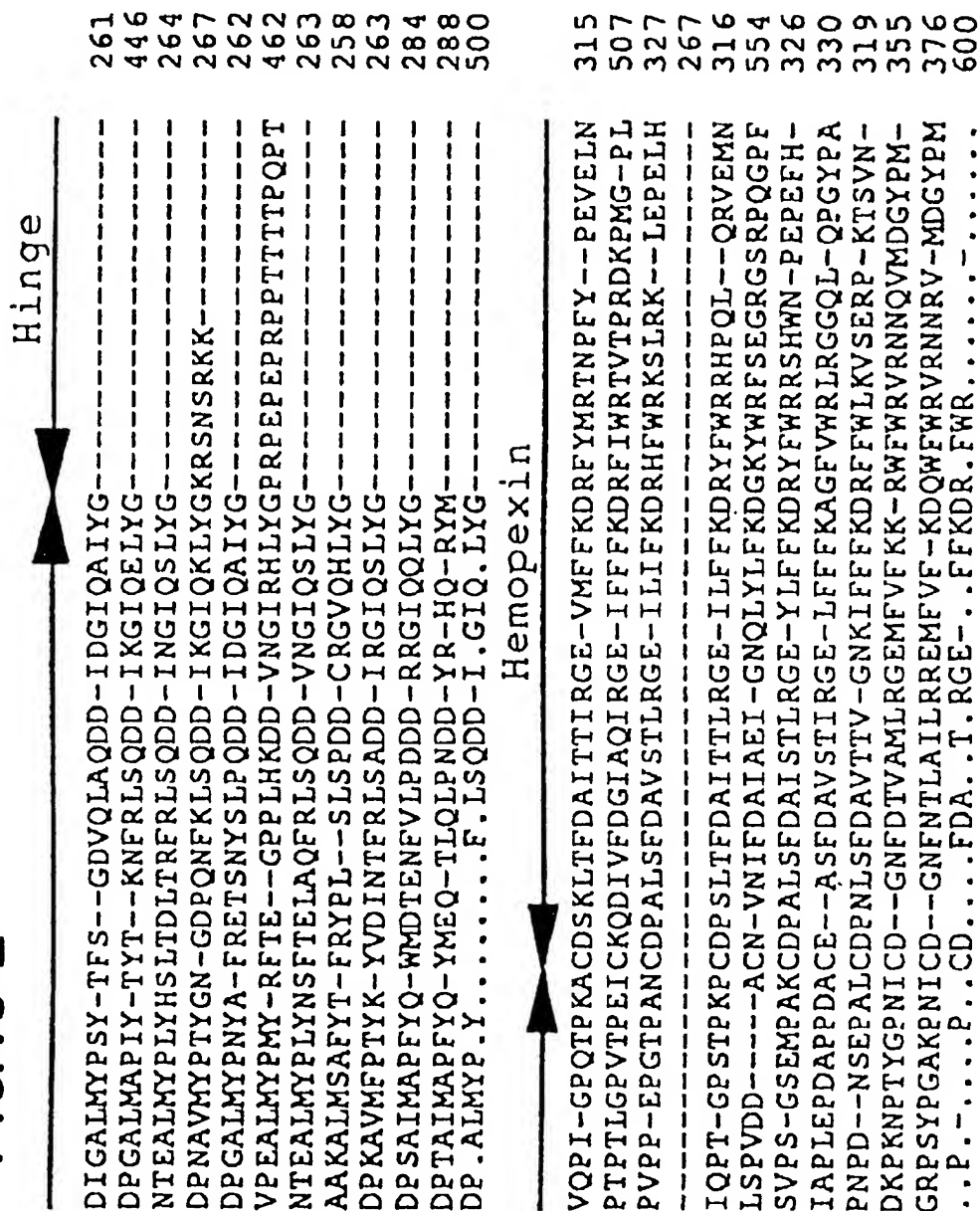


FIG. ID-1

Hemopexin

MMP-1	FTSVFWPQLPNGLEAAYEFADRDDEVRFKGNKYWAV-QGQNVLHGYPKDIYSFGFPR
MMP-2	LVATFWPELPEKIDAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIY-SASTLERGYPKPLTS-LGLPP
MMP-3	LISSEFWPSLP SGVDAAYEVTSKDLVFIKGNQFWAI-RGNEVRAGYPRGIHT-LGFPP
MMP-7	-----
MMP-8	FISLFWPSLPTGIQAAYEDEFDRDLIFLEKGNQYWAL-SGYDILQGYPKDISN-YGFPS
MMP-9	LIADKWPALPRKLDVSFEELPSKKLFFFSGRQVWVYTGASVL--G-PRRLDK-LGLGA
MMP-10	LISAFWPSLPSYLDAAAYEVNSRDTVFIFKGNQFWAI-RGNEVQAGYPRGIHT-LGFPP
MMP-11	LASRHWQGLPSPVDAAFE-DAQHIWFFQGAQYWVY-DGEKPVLG-PAPLTE-LGLVR
MMP-12	LISLWPTLPSGIEAAYEIEARNQVFLFKDDKYWLI-SNLRPEPNYPKSIHS-FGFEN
MT-MMP-1	PIQFWRGLPASINTAYERKDGKFVF-FKGDKHVVF-DEASLEPGYPKHIKE-LGRGL
MT-MMP-3	QITYFWRGLPPSIDAVYENS DGNFVF-FKGNKYWVF-KDTTLQPGYPHDLIT-LGSGI
Consensus	LIS.FWP.LP...DAAYE.....VF.FKGN.YW...I..-LG.P.

Hemopexin

MMP-1	MI AHDFPGIGHKVDVAVFMKDGFF--YFFHGTQYKEDPKT-KRILTL-QKANS-WFNC
MMP-2	LIADAWNAI PDNLDAVVLDQGGCHSYFFKGAAYLKLENQS-LKSVKF-GSIKSDLGCG
MMP-3	QIAEDFPGIDSKIDAVFEEFGFF--YFFTGSQQLEFDPNA-KKVTHT-LKSNS-WLNC
MMP-7	-----
MMP-8	SISGAFPGIESKVDVAVFQQEHFF--HVFSGPRYYAFDLIA-QRVTRV-ARGNK-WLNC
MMP-9	EVDRMFPGVPLDTHDVFYREKA--YFCQDRFYWRVSSRSELNQVDQGVYTYDILQC
MMP-10	LIADDFPGVEPKVDVAVLQAFGEF--YFFSGSSQFEFDPNA-RMVTHI-LKSNS-WLHC
MMP-11	R-ATDWRGVPSIDAFAFQDADGYA-YFLRGRLYWKEDPVK-VKALEGFPRLVGPDEF
MMP-12	LITKNFQGI GPKIDAVFYSKNKY-YFFQGSNQFEYDFLL-QRITKT-LKSNS-WFGC
MT-MMP-1	NIKVWE-GIPESPRGFMGSDVEFTFYFKGNKYWKFNQKLVKVEPGYPKSLRDMGCG
MT-MMP-3	PITVWK-GIPESPOGAFVHKENGFTFYFKEGVLEIQTRYSRLEPGHPR SILKDLSGC
Consensus	.I...F.GI....DAVF.....YFF.G.....FD.....-W...C

FIG. ID-2

TVKHIDAA-LSEENTGKTYFFVANKYWRDYDEYKRSMDPGYPK	413
DVQRVDAA-FNWSKNKKTYYIFAGDKFWRYNVKKKMDPGFPK	604
TVRKIDAA-ISDKEKNKTYFFVEDKYWRFEDEKRNSMEPGFPK	424
-----	267
SVQAIDAA-VFYRS--KTYFFVNDQFWRYDNQRQFMPEGYPK	411
DVAQVTGA-LRSGR-GKMLLFSGRRLWRFDVKAQMVDPRSAS	648
TIRKIDAA-VSDKEKKKTYFFFAADKYWRFDENSQSMEQGFPR	423
FP--VHAALVWGPEKNKIYFFRGRDYWRFHSTRRVDSVPVR	424
FVKKIDAA-VFNPRFYRTYFFVDNQYWRDYDERRQMDPGYPK	416
PTDKIDAA-LFWPNGKTYFFRGNKYRFFNEELRAVDSEYPK	451
PPHGIDSA-IWEDVGKTYFFKGDYWRYSSEEMKTMDPGYPK	472
.V..IDAA-.....KTYFF....YWR.DE....MDPG.PK	700
RKN-----	469
-----	660
-----	477
-----	267
RYG-----	467
PED-----	707
-----	476
CAEPANTFL-----	488
-----	470
PSGGRPDEGTEETE-VIIIEVDEEGGAVSAAAVLPLVLL	549
DGPTDRVKEGHSPPDDVDIVIKLDNTASTVKAIIVIPCILA	571
-----	800

↑ IS-3

FIG. 1E

MMP-1	-----	469
MMP-2	-----	660
MMP-3	-----	477
MMP-7	-----	267
MMP-8	-----	468
MMP-9	-----	708
MMP-10	-----	476
MMP-11	-----	489
MMP-12	-----	470
MT-MMP-1	LLVLAVGLAVFFRRHGTPTRRLLYCQRLLDKV	582
MT-MMP-3	LCLLVLVYTVFQFKRKGTPRHI LYCKRSMQEWV	604
Consensus	-----	833

FIG. 2

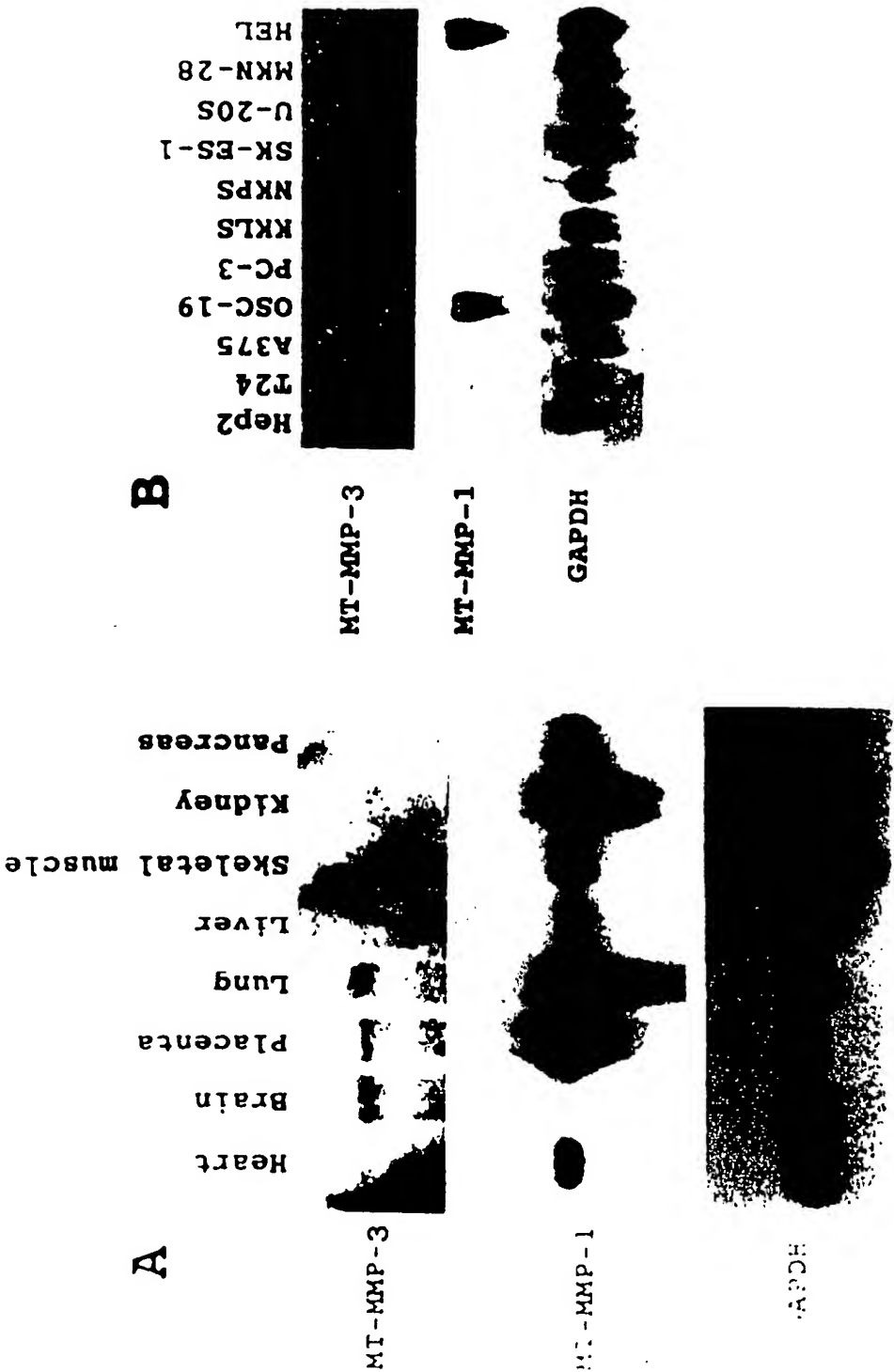


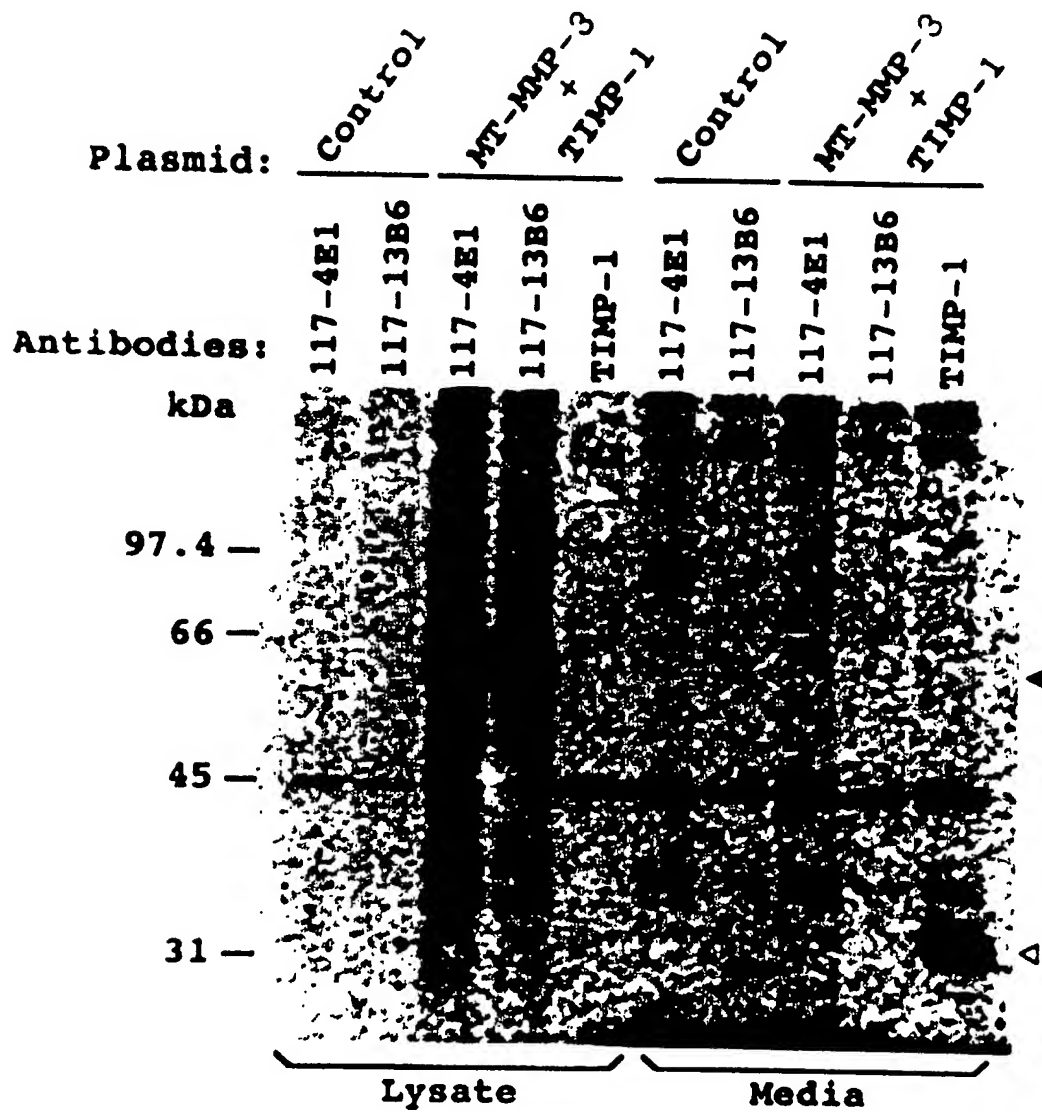
FIG. 3

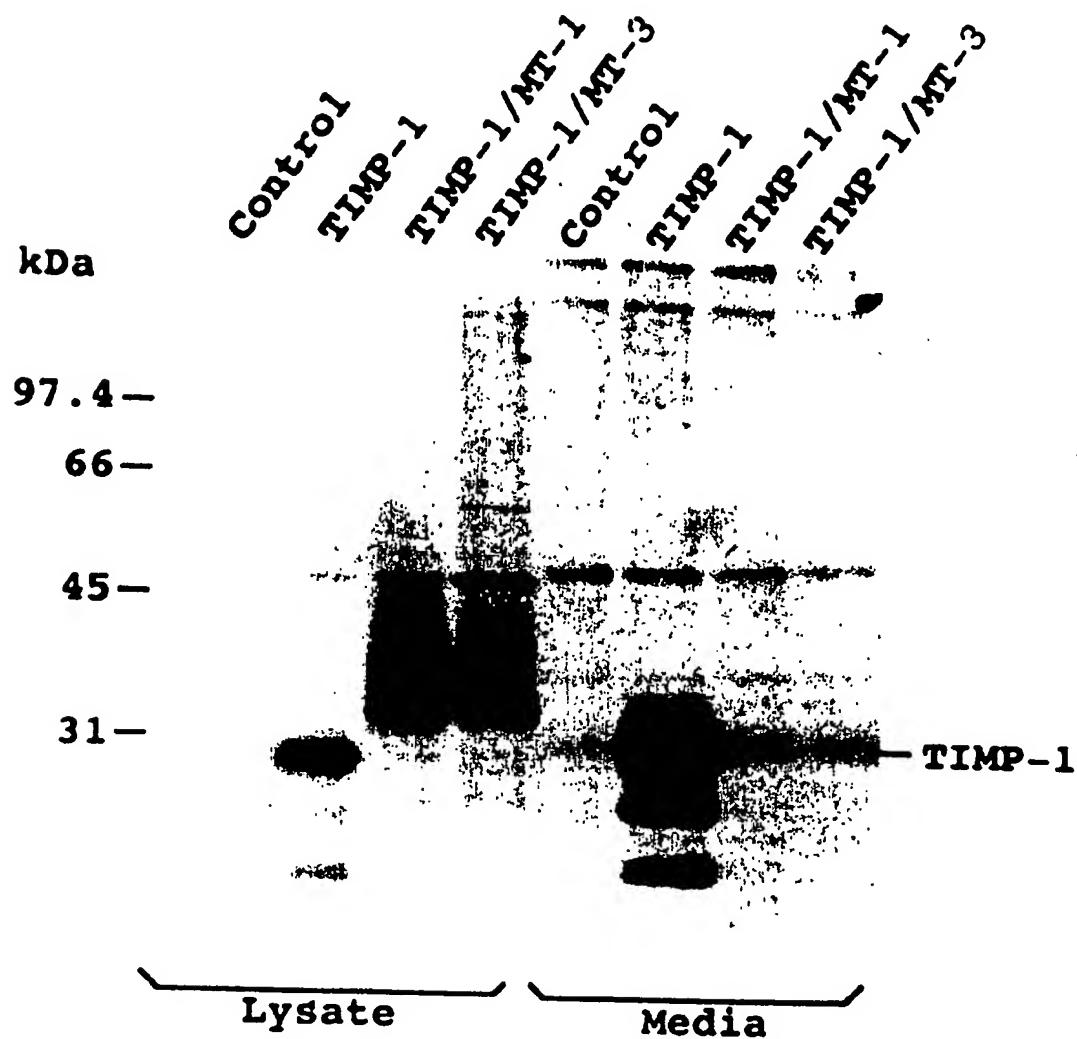
FIG. 4

FIG. 5

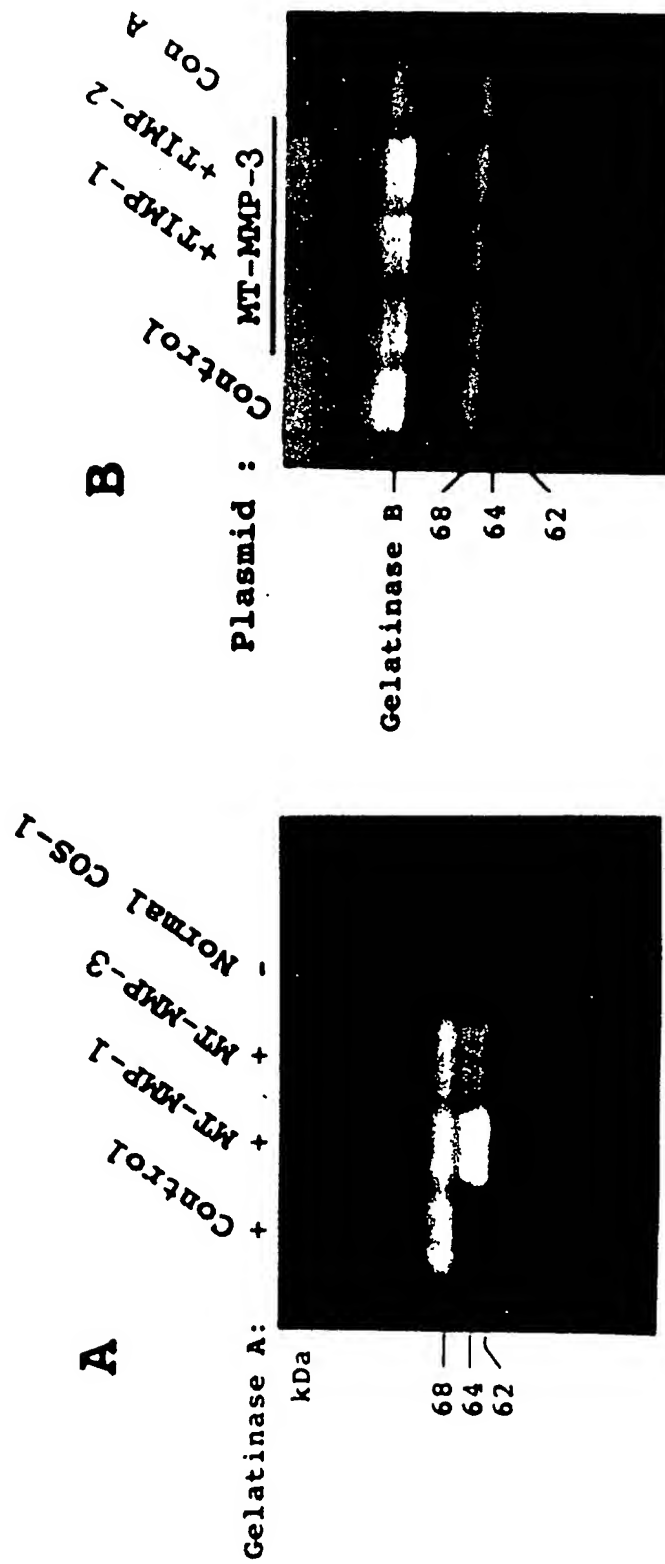
Control



TIMP-1/MT-3



FIG. 6



US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

1

NOVEL PROTEIN AND MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC THERETO

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to a novel protein useful as a diagnostic tool for studies and researches relating to diagnostic and therapeutic applications to tumors, including uses in detecting tumor cells, estimating cancer malignancies, etc., and/or useful in other medical and physiological uses; and to a novel gene encoding said protein. More specifically, the present invention relates to a new membrane-type protein which is one of the MMPs having the activation capability of pro-matrix metalloproteinase 2 (pro-MMP-2), i.e. an activator for pro MMP-2, provided that said protein is different from the first membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-1), and to a gene coding for said protein. The present invention also encompasses a novel matrix metalloproteinase being specifically expressed in a human tumor cell surface layer (the instant novel matrix metalloproteinase is named "membrane-type matrix metalloproteinase-3 (MT-MMP-3)"); DNA containing a nucleotide sequence coding the protein; a host cell transformed or transfected with the DNA, a process for producing the matrix metalloproteinase which comprises using said host cell, a monoclonal antibody capable of specifically binding with the matrix metalloproteinase protein, and applications of said protein and antibody.

BACKGROUND ART

[0002] An extracellular matrix may block the transfer of tumor cells for the invasion and metastasis of tumor cells that are present in a primary nest tissue. In order for tumor cells to transfer and invade into tissues, they must deviate from the primary nest and destroy peripheral extracellular matrixes. The metastasis of tumor cells progresses via destroy of basement membranes, invasion into and effusion from blood vessels, successful implantation on secondary organs, further growth, etc. The extracellular matrix that blocks tumor metastasis is composed of various complex components, including type IV collagen, proteoglycans, elastin, fibronectin, laminin, heparan sulfate, etc. A family of enzymes, generally named "Matrix Metalloprotenase" (hereinafter briefly referred to as "MMP"), with distinct substrate specificities are responsible for the degradation of the extracellular matrix.

[0003] It has been reported that MMP includes fibroblast-type collagenase (MMP-1), 72 kDa gelatinase (referred to as type IV collagenase or gelatinase A; MMP-2), 92 kDa gelatinase (referred to as type IV collagenase or gelatinase B; MMP-9), stromelysin-1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), neutrophilic collagenase (MMP-8), stromelysin-2 (MMP-10), stromelysin-3 (MMP-11), etc. (Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 4: 197 to 250, 1993). These MMPs form a family, and the primary structure of genes has been already reported. The reported amino-acid sequences deduced from cDNA data of these MMPs are recognized to be homologous, which are constituted of an N-terminal signal peptide basically removed during secretion and processing, followed by a propeptide domain, a Zn²⁺-binding catalytic domain, a proline-rich hinge domain composed of 5 to 50 amino acids, and a C-terminal hemopexin coagulation enzyme-like domain. There is no hemopexin-like domain in MMP-7. MMP-2 and MMP-9 include a gelatine-binding domain in addition to these.

[0004] Among these MMPs, it has been reported many times that type IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) acting on, as a dominant substrate, type IV collagen that is a principal constituent for basement membranes is highly expressed in high metastatic tumor cells and there has been suggested that tumor cells are associated with tumor invasion into basement membrane invasion (Cell., 64: 327 to 336, 1991).

[0005] The regulation of MMP activation is believed to be performed in steps including at least transcription level, a step for converting a proenzyme form wherein its enzymatic activity is latent into an active enzyme form, and controls by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) being a specific inhibitor against MMPs, etc. (Trends Genet., 6: 121 to 125, 1990).

[0006] All of the MMPs are secreted as inactive zymogens. In in vitro studies, activation of MMP-1 and MMP-9 is shown to be produced with serine proteinases such as plasmin, trypsin, cathepsin G. It has also been reported that activation of MMP-9 is caused by the action of active MMP-3 (J. Biol. Chem., 267: 3581 to 3584, 1992). However, since MMP-2 has no cleavage site sensitive to the above mentioned proteinase, activation of MMP-2 is believed not to be generated thereby (Curr. Opin. Cell Biol., 5: 891 to 897, 1993).

[0007] It has also been reported that these MMPs are produced by not only tumor cells but also circumferential fibroblasts and inflammatory cells which produce distinct MMPs, respectively (Breast Cancer Res. Treat., 24: 209 to 218, 1993; and Curr. Opin. Cell Biol., 5: 891 to 897, 1993).

[0008] It has previously been reported that, among them, MMP-2 is expressed in fibroblasts at a variety of sites accompanied with remodeling of tissue constructs and its activation is specifically generated in cancer tissues exemplified by lung cancer, in comparison with normal tissue and cancer tissue MMP-2s (Clin., Exp., Metastasis, 11: 183 to 189, 1993). In MMP-9, there is a low frequency that an active type is detected. In addition, there is proved in in vitro studies that active MMP-2 is localized at the apical site of tumor invasion (invadopodia) and it is suggested that the active MMP-2 has an important role on tumor invasion (Cancer Res., 53: 3159 to 3164, 1993; and Breast Cancer Res. Treat., 53: 3159 to 3164, 1994).

[0009] Under these backgrounds, attention has been focused on the activation mechanism of MMP-2. As described previously, however, activation of MMP-1 and MMP-9 is mediated by serine proteinases such as trypsin while the activation mechanism of MMP-2 is still undisclosed. In particular, an activating factor for MMP-2 remains unidentified. When HT1080 cells (MMP-2 producing cells) are treated with concanavalin A or 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), it is known that active MMP-2 appears in cultured medium, and it is believed that MMP-2 activating factors are induced in these cells (J. Natl. Cancer Inst., 85: 1758 to 1764, 1993; and Clin. Exp. Metastasis, 11: 183 to 189, 1993). Since this MMP-2 activation is induced by cellular membrane fractions and the activation is suppressed by chelating agents or TIMP, the MMP-2 activating factors have been presumed to be a membrane-type MMP (J. Biol. Chem., 268: 14033 to 14039, 1993).

[0010] The present inventors have previously cloned novel MMP genes using genetic engineering techniques, and

obtained cloned genes coding for a new MMP having a typical transmembrane (TM) domain at the C-terminus thereof and being capable of activating MMP-2 (Nature, 370: 61 to 65, 1994). In fact, when this gene is expressed in cultured cells, the gene products are localized on the cell membrane without secretion. Thus, the present inventors have named such MMP as "membrane-type MMP (MT-MMP)".

[0011] Since, as described above, for MMPs, specifically MMP-2, the active form is found specifically in tumor cells, it is increasingly recognized that such should be targeted by anti-cancer or anti-metastatic drugs. Still, since MMP-2 exists relatively homeostatically as a zymogen in normal tissues, the regulation of MMP-2 activation resides in a process of activating it to active enzymes. Therefore, it is considered that the retrieval or identification of activating factors which are keys to this is extremely important in view of markers in the diagnosis of cancers and in the determination of malignancy and targets of anti-metastatic drugs against cancers.

[0012] In addition, it has been pointed out that MMP-2 may be involved in the cleavage of β -amyloid protein which is associated with the crisis of Alzheimer's diseases. The β -amyloid protein is a part of amyloid protein precursors, $\frac{1}{4}$ of β -amyloid protein area is included in the membrane-spanning (or transmembrane) area of the amyloid protein precursor, and the rest is outside the cells. It has been recently disclosed that several metabolic pathways of amyloid protein precursors exist, one of which is a process including a cleavage of inner sites of the β -amyloid protein area with a protease called " α -secretase" and a discharge outside cells. It has been recently found that an amyloid protein-degrading activity is present in MMP-2, with the possibility that MMP-2 would function as α -secretase or an extracellular β -amyloid protein-degrading enzyme (Nature, 362 : 839, 1993). The β -amyloid protein is the main component of senile macula observed in the brains of patients with Alzheimer's diseases, and forms the core of senile macula by self-aggregation and deposition thereof. Since functional reduction of β -amyloid protein-degrading enzymes may occur in the brain of the patient with Alzheimer's diseases, attention is focused on MMP-2. Here, the key is a process for activating MMP-2. The MT-MMP previously identified by the present inventors (newly named "MT-MMP-1" herein) is believed to be an activating factor for MMP-2, but the existence of unknown MMPs such as MT-MMP-1 can be anticipated from the fact that a variety of components exists in the extracellular matrix. The existence of activating factors for MMP-2, other than MT-MMP-1, is still undeniable.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0013] A primary object of the present invention is to provide novel proteins which (i) belong to a member of MMPs having the capability of activating pro MMP-2, (ii) are different from MT-MMP-1, (iii) have the capability of activating pro MMP-2, and (iv) are an activator for pro MMP-2; genes encoding the same; processes for producing said novel pro MMP-2 activating factor proteins; applications of the protein and gene, etc.

[0014] The present inventors have observed that an activating factor (activator) for pro MMP-2 is assumed as a

member of membrane-type MMPs since activation of pro MMP-2 is induced by tumor cell membrane fractions and the activation is inhibited by chelating agents or TIMP; the present inventors thus have isolated the gene coding for novel MMP-2 capable of activating pro MMP-2 in the prior research. However, the present inventors have hypothesized the existence of MMP acting as a MMP-2 activator in addition to the above, or MMP biochemically differing from the known MMPs. Following various researches using genetic engineering techniques, the present inventors successfully isolated a gene coding for MMP that is a novel activating factor for pro MMP-2, and completed the present invention.

[0015] It has been known that MT-MMP-1 is a member of MMPs capable of activating pro MMP-2; however, other activating factors for pro MMP-2 have been neither isolated nor identified. The present inventors have now cloned novel MMP genes, i.e. pro MMP-2 activating factor genes, and disclosed an entire nucleotide sequence of the gene and an entire amino acid sequence thereof. The inventors originally named this novel MMP as "MT-MMP-2" (Japanese Patent Application, Nos. Hei 7-200319 (or JP Appln. No. 200319/1995) and 7-200320 (or JP Appln. No. 200320/1995), both filed on Jul. 14, 1995). Later, at the Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases (Andover, N.H., Jul. 16-21, 1995), it was agreed upon renaming "MT-MMP-3" (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, pp. 23013-23020 (1995)). Therefore, the instant "MT-MMP-3" indicates the substance identical with MT-MMP-2 as described in Japanese Patent Application Nos. 7-200319 and 7-200320.

[0016] The present invention relates to novel proteins, i.e. MT-MMP-3 and analogs thereof. Further, the present invention relates to novel DNA sequences coding for all or part of MT-MMP-3, to vectors having such DNA sequences, and to host cells transformed or transfected with such vectors. The present invention also includes the production of recombinant MT-MMP-3 and uses of said recombinant MT-MMP-3. The present invention relates to antibodies which specifically bind with MT-MMP-3. In another aspect, the present invention relates to reagents for measurement or assay which contain said product and to detecting, measuring or assaying methods using such reagents. In particular, methods for detecting or measuring MT-MMP-3 in vivo and in vitro are provided.

[0017] The present invention relates to (1) proteins or a salt thereof which (i) belong to a member of MMPs capable of activating pro MMP-2 but are not MT-MMP-1, (ii) are an activator for pro MMP-2 and (iii) have an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, or a salt thereof; (2) characteristic partial peptides of said protein or a salt thereof; (3) genes (for example, nucleic acids including DNA, RNA, etc.) coding for said protein or peptide; (4) vectors or plasmids which contain said gene operably with gene recombination techniques; (5) host cells transformed or transfected with such vectors or the like; (6) processes for producing said protein or a salt thereof which comprises culturing said transformed or transfected host cell (transformant or transfectant); (7) antibodies (in particular, monoclonal antibodies) obtained using a member selected from the group consisting of the protein or a salt thereof thus obtained in the above process and the characteristic partial peptide of the protein or a salt thereof thus obtained in the

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

3

above process; (8) hybridoma cells which produce the antibody; and (9) measuring (assaying) and/or diagnostic means (i) using the isolated gene (including, for example, DNA, RNA, etc.) as a probe or (ii) using the antibody.

[0018] Particularly, the present invention relates to (1) proteins which (i) belong to a member of MMPs capable of activating pro MMP-2, (ii) are an activator for pro MMP-2 but different from MT-MMP-1 and (iii) have an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP-3, or a salt thereof; (2) characteristic partial peptides of said protein or a salt thereof; (3) genes (including, for example, DNA, RNA, etc.) coding for said protein or peptide; (4) vectors or plasmids wherein said gene is contained operably with gene recombination techniques; (5) host cells transformed or transfected with such a vector or the like; (6) processes for producing said protein or a salt thereof which comprises culturing said transformed or transfected host (transformant or transfectant)); (7) antibodies (in particular, monoclonal antibodies) obtained using a member selected from the group consisting of said protein or a salt thereof thus obtained and the unique partial peptide of said protein or a salt thereof thus obtained; (8) hybridoma cells which produce the antibody; and (9) measurement (assay) and/or diagnosis means (i) using the isolated gene (including, for example, DNA, RNA, etc.) as a probe or (ii) using the antibody.

[0019] Preferably, the present invention is related to MT-MMP-3 or a salt thereof which has (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent to SEQ ID NO: 2.

[0020] The present invention provides:

[0021] (1) a protein or a salt thereof, which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1;

[0022] (2) the protein according to above (1), wherein the protein has a biological property or primary structural conformation identical with or substantially equivalent to that of native MT-MMP-3 or a salt thereof;

[0023] (3) the protein according to above (1) or (2), wherein a C-terminal area of the protein has (i) an amino acid sequence from Ala⁵⁶¹ to Phe⁵⁸⁴ in the sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent thereto;

[0024] (4) the protein according to any of above (1) to (3), wherein the protein is MT-MMP-3 or a salt thereof which has (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence equivalent thereto;

[0025] (5) the protein according to any of above (1) to (4), wherein the protein is the product of prokaryotic or eukaryotic expression of an exogenous DNA sequence;

[0026] (6) the protein according to any of above (1) to (5), wherein the protein has (i) the amino acid

sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) the substantially same amino acid sequence;

[0027] (7) a partial peptide (or a peptide fragment) of the protein according to any of above (1) to (6) or a salt thereof;

[0028] (8) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence coding for the protein or the partial peptide according to any of above (1) to (7);

[0029] (9) the nucleic acid according to above (8) which is a DNA gene having a nucleotide sequence coding for MT-MMP-3 according to any of above (2) to (4);

[0030] (10) the nucleic acid according to above (8) or (9), having (i) an open reading frame region of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing or (ii) a nucleotide sequence having an activity substantially equivalent thereto;

[0031] (11) a vector comprising the nucleic acid according to any of above (8) to (10);

[0032] (12) a transformant or transfectant harboring (i) the nucleic acid according to any of above (8) to (10) or (ii) the vector according to above (11);

[0033] (13) a process for producing the protein according to any of above (1) to (6) or a partial peptide thereof, which comprises:

[0034] (i) culturing the transformant or transfectant according to above (12) in a nutrient medium capable of growing said transformant or transfectant, and

[0035] (ii) producing, as a recombinant species, the protein according to any of above (1) to (6) or a partial peptide thereof, including MT-MMP-3 or a salt thereof;

[0036] (14) an antibody against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof;

[0037] (15) the antibody according to above (14), wherein the antibody is against the protein which has an activity or a primary structural conformation identical with or substantially equivalent to that of MT-MMP-3 or a salt thereof;

[0038] (16) the antibody according to above (14) or (15), wherein the antibody is against the protein that is MT-MMP-3 or a salt thereof having (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent thereto;

[0039] (17) the antibody according to any of above (14) to (16), wherein the antibody is against the protein which is a product obtained by expressing a foreign DNA sequence in prokaryotic or eukaryotic cells;

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

4

- [0040] (18) the antibody according to any of above (14) to (17), wherein the antibody is against the protein which has (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) the substantially same amino acid sequence;
- [0041] (19) the antibody according to any of above (14) to (18), wherein the antibody is against a partial peptide of the protein or a salt thereof;
- [0042] (20) the antibody according to any of above (14) to (19), wherein the antibody is an anti-serum;
- [0043] (21) the antibody according to any of above (14) to (19), wherein the antibody is monoclonal;
- [0044] (22) the antibody according to any of above (14) to (19) and (21), which is a monoclonal antibody against MT-MMP-3 or a salt thereof;
- [0045] (23) a method for producing an antibody against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof, which comprises employing an antigen selected from the group consisting of said protein, said partial peptide and a salt thereof to raise the antibody thereagainst;
- [0046] (24) a method for producing the antibody according to above (21) or (22), which comprises
- [0047] (A) fusing an antibody-producing cell obtained from an immunized animal with an immortal cell, wherein said antibody is against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof and said animal is immunized with the protein, the partial peptide or a salt thereof, and
- [0048] (B) selecting an immortal hybrid cell capable of an antibody against a protein including MT-MMP-3;
- [0049] (25) a method for detecting and/or measuring MT-MMP-3, which comprises using (A) a reagent selected from the group consisting of (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, and (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof, or (B) a reagent selected from the group consisting of the antibodies according to any of above (14) to (22);
- [0050] (26) a labeled antibody against MT-MMP-3 for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 (the detection and/or measurement of MT-MMP-3) according to above (25);
- [0051] (27) a labeled protein or a salt thereof, for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 (the detection and/or measurement of MT-MMP-3) according to above (25), wherein said labeled protein (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or a labeled partial peptide of said protein or a salt thereof, for the method according to above (25);
- [0052] (28) a labeled nucleic acid for detection and/or measurement of MT-MMP-3 expressing cells and/or tissues, wherein said nucleic acid encodes (A) a protein which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (B) a partial peptide of said protein; and
- [0053] (29) the nucleic acid according to above (28), which is a probe for hybridization.
- [0054] In particular, the present invention provides:
- [0055] (30) MT-MMP-3 or a salt thereof which has an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or an amino acid sequence substantially equivalent thereto;
- [0056] (31) a partial peptide of MT-MMP-3 or a salt thereof according to above (30);
- [0057] (32) a DNA gene comprising a nucleotide sequence coding for MT-MMP-3 according to above (30);
- [0058] (33) the DNA gene according to above (32), which has a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing;
- [0059] (34) a vector comprising the gene according to above (32);
- [0060] (35) a transformant (or transformed cell) harboring (i) the gene according to above (32) or (ii) the vector according to above (34);
- [0061] (36) a process for producing MT-MMP-3 or a salt thereof, which comprises culturing the transformant according to above (35) in a nutrient medium capable of growing said transformant to produce, as a recombinant protein, said MT-MMP-3 or a salt thereof;
- [0062] (37) a process for producing an antibody against MT-MMP-3 or a salt thereof, which comprises using an antigen selected from the group consisting of MT-MMP-3 or a salt thereof according to above (30) and a partial peptide of said MT-MMP-3 or a salt thereof to raise the antibody thereagainst;
- [0063] (38) an antibody against MT-MMP-3 according to above (31);
- [0064] (39) the antibody (anti-MT-MMP-3 antibody) according to above (38), which is anti-serum;

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

5

[0065] (40) the antibody (anti-MT-MMP-3 antibody) according to above (38), which is monoclonal;

[0066] (41) a process for producing a monoclonal antibody against MT-MMP-3 (monoclonal anti-MT-MMP-3 antibody; anti-MT-MMP-3 mAb) according to above (40), which comprises fusing an anti-MT-MMP-3 antibody-producing cell with an immortal cell and selecting an immortal hybrid cell (hybridoma cell) capable of producing anti-MT-MMP-3 mAb, wherein said anti-MT-MMP-3 antibody-producing cell is obtained from an animal immunized with a member selected from the group consisting of MT-MMP-3 or a salt thereof according to above (30) and a partial peptide of said MT-MMP-3 or a salt thereof;

[0067] (42) a method for detecting and/or measuring MT-MMP-3, which comprises using (A) a reagent selected from the group consisting of MT-MMP-3 or a salt thereof according to above (30) and a partial peptide of said MT-MMP-3 or a salt thereof, or (B) a reagent selected from the group consisting of anti-MT-MMP-3 antibodies according to above (38);

[0068] (43) Labeled MT-MMP-3 or a salt thereof, or a labeled partial peptide of MT-MMP-3, for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 according to above (42); and

[0069] (44) a labeled antibody against MT-MMP-3 (labeled anti-MT-MMP-3 antibody) for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 according to above (42).

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

[0070] FIGS. 1A to 1E illustrate the domain structure of MT-MMP-3 according to the present invention, in comparison with the known MMP family members: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, and MT-MMP-1. An alignment of amino acid sequences of the MMP family members is shown wherein the homology among the amino acid sequence of MT-MMP-3 and the reported amino acid sequences of the known MMP family members: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, and MT-MMP-1 is compared. Each amino acid residue is indicated by a conventional single character symbol, and numbered, provided that the N-terminus of pre-type proteins is designated as the first amino acid residue.

[0071] FIG. 2 is photographs showing the electrophoretic results of Northern blotting.

[0072] A: RNA blot analysis of MT-MMP-3 mRNA in various human tissues by Northern blotting.

[0073] B: RNA blot analysis of MT-MMP-3 mRNA in various cultured human malignant cell lines by Northern blotting.

[0074] FIG. 3 is a photograph showing the electrophoretic results of immunoprecipitation of cell lysates and conditioned culture medium wherein MT-MMP-3 cDNA was expressed in COS-1 cells and MT-MMP-3 gene products (MT-MMP-3 proteins) were examined.

[0075] In autoradiography, MT-MMP-3 protein (64 kDa) and TIMP-1 protein (28 kDa) are indicated by arrows: A and A respectively.

[0076] FIG. 4 is a photograph showing the electrophoretic results of the study that the fusion protein having a continuous sequence with TIMP-1/hydrophobic amino acid stretch at the C-terminus of MT-MMP-3 was prepared to examine the role of the continuous sequence composed of the hydrophobic amino acids at the C-terminus of MT-MMP-3 as a transmembrane (TM) domain.

[0077] A: The fusion proteins (chimeric proteins) constructed by gene engineering techniques were expressed in COS-1 cells and cell lysates and conditioned culture medium thereof were examined. The electrophoretic results detected by autoradiography are shown.

[0078] FIG. 5 is photographs showing the results of immunofluorescence staining wherein the fusion protein having a continuous sequence with TIMP-1 hydrophobic amino acid stretch at the C-terminus of MT-MMP-3 was prepared to examine whether the continuous sequence composed of the hydrophobic amino acids at the C-terminus of MT-MMP-3 functions as a transmembrane (TM) domain.

[0079] B: Biological figures observed by immunofluorescence staining when the chimeric proteins having the continuous sequence with TIMP-1/hydrophobic amino acid stretch were expressed in COS-1 cells.

[0080] FIG. 6 is photographs showing the electrophoretic results of zymography analysis of activation of pro MMP-2 by MT-MMP-3 expression.

[0081] A: Activation of pro MMP-2 in COS-1 cells, wherein COS-1 cells cotransfected with MT-MMP-3 cDNA and pro MMP-2 cDNA.

[0082] B: Activation of pro MMP-2 by MT-MMP-3 and effect of TIMP-1 and TIMP-2 in HT 1080 cells into which MT-MMP-3 cDNA was cotransfected.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0083] The present invention provides (1) a protein or a salt thereof (i) that is a member of MMPs capable of activating pro MMP-2 but is not MT-MMP-1, (ii) that has an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP (for example, MT-MMP-3) which is a pro MMP-2 activation factor; (2) a specific partial peptide of that protein or a salt thereof; (3) a gene (such as DNA or RNA) coding for the same; (4) a vector or plasmid containing the gene operably by gene recombination techniques; (5) a host cell transformed by such a vector; and (6) a method for producing the protein or a salt thereof by culturing the host cell; (7) an antibody (in particular a monoclonal antibody) obtained using a species selected from the group consisting of the protein thus obtained or a salt thereof and partial peptides (peptide fragments) unique thereto or a salt thereof; (8) a hybridoma cell producing the antibody, and (9) measurement and diagnosis means using as a probe the isolated gene, such as DNA or RNA, or using the antibody.

[0084] More particularly, the present invention provides (i) MT-MMP-3 or a salt thereof which has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing. The MT-MMP-3 of the present invention may include those that are pro MMP-2 activating factors and have a new amino acid

sequence as long as they are members of MMPs capable of activating pro MMP-2 but different from MT-MMP-1 and are capable of activating pro MMP-2. More preferably, the MT-MMP-3 of the present invention includes all substances having an amino acid sequence identical with or substantially equivalent to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing. Furthermore, the MT-MMP-3 of the present invention may have (i) as a pre portion, part or all of the amino acid sequence ranging from the first amino acid residue: Met to the 21st amino acid residue: Phe, and/or (ii) as a pro portion part or all of the amino acid sequence ranging from the 22nd amino acid residue: Phe to the 119th amino acid residue: Arg. All of MT-MMP-3 that have such a sequence may be included herein.

[0085] The MT-MMP-3 can be encoded by a nucleotide sequence comprising a region ranging between ATG from the 113rd to 115th nucleotide residues of SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing and GTG from the 1922nd to 1924th nucleotide residues (termination codon: TGA from the 1925th to 1927th nucleotide residues may be replaced with TAA or TAG), and can also be encoded by any DNA sequence containing a nucleotide sequence homologous to the above nucleotide sequence but different from the MT-MMP-1 sequence as long as it is equivalent to a sequence for a species capable of activating pro MMP-2. The MT-MMP-3 nucleotide sequences can be modified (by addition, deletion, substitution), and those thus modified may be included herein.

[0086] The DNA containing a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 or an equivalent thereof according to the present invention may be cloned and obtained, for example, by the following techniques:

[0087] It should be noted that gene recombination techniques may be conducted, for example, by the methods disclosed in T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. T. (1989); Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Kouza 1, Idenshi Kenkyuho II (Lectures on Biochemical Experiments (Second Series: 1), Methods for Gene Study II)", Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1986); Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Shin-Seikagaku Jikken Kouza 2, Kakusan III (Kumikae DNA Gijutsu) (New Lectures on Biochemical Experiments 2, Nucleic Acids III (Recombinant DNA Technique))", Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1992); R. Wu (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 68, Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vols. 100 & 101, Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vols. 153, 154 & 155, Academic Press, New York (1987), etc. as well as by techniques disclosed in the references cited therein, the disclosures of which are hereby incorporated by reference, or by the substantially same techniques as they disclose or modified techniques thereof. Such techniques and means may also be those which are individually modified/improved from conventional techniques depending upon the object of the present invention. mRNA samples can be isolated from various human tissues (placenta, oral tumor, lung cancer, etc.), culture cells (human fibrosarcoma HT1080 cell line, human monocytic leukemia U937 cell line, etc.) and the like. In particular, mRNA can preferably be isolated from a human oral tumor cell (oral malignant melanoma). Although, in an embodiment, mRNA

may be isolated with a method known in the art or by the substantially same method as it is or modifications thereof, the isolation and purification of mRNA can be conducted by methods disclosed in, for example, T. Maniatis, et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. T. (1989); L. Grossman, et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Parts A & B, Academic Press, New York (1968); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p. 33 & p. 215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979; etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Examples of such mRNA isolating and purifying techniques are a guanidine-cesium chloride method, a guanidine thiocyanate method, a phenol method, etc. If necessary, the resulting total RNA may be subjected to a purification process using an oligo(dT)-cellulose column, etc. to give poly(A) mRNA. cDNAs are prepared by using, as a template; the resulting mRNA and a reverse transcriptase, etc. The reverse transcriptase synthesis of cDNA using mRNA may be carried out by standard techniques known in the art, by the substantially same techniques or by modified techniques thereof. Detailed techniques are found in, for example, H. Land et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 9, 2251 (1981); U. Gubler et al., "Gene", Vol. 25, 263-269 (1983); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p. 307, Academic Press, New York (1987); etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

[0088] Then, based upon the cDNA thus prepared, cDNA libraries can be constructed. Besides the technique using a phage vector, transformations of host cells including *Escherichia coli* may be conducted according to techniques known in the art, such as a calcium technique and a rubidium/calcium technique, or the substantially same methods (D. Hanahan, J. Mol. Biol., Vol. 166, p. 557 (1983), etc.). Various commercially available cDNA libraries derived from human tissues (for example, obtainable by CLONTECH, etc.) can also be used directly. A polymerase chain reaction (PCR) is conducted using the prepared cDNA as a template. In an embodiment, primers are synthesized which have degenerate oligonucleotides designed from highly conserved regions selected from amino acid sequences in a family of known MMPs. Preparation of primers may be carried out by techniques which are known in the art. For example, the primers may be synthesized by means of a phosphodiester method, a phosphotriester method, a phosphoramidite method, etc. using an automatic DNA synthesizer. The PCR amplification is carried out using said primers and the template cDNA thus prepared. The PCR may be carried out by techniques known in the art or by methods substantially equivalent thereto or modified techniques. The reaction may be conducted by the methods disclosed, for example, in R. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); and PCR Technology, Stockton Press; etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

[0089] The resulting PCR products are cloned, and sequenced. As a result, DNA fragments having a novel MMP gene sequence are acquired. Sequencing of nucleotide sequences may be carried out by a dideoxy technique (such as an M13 dideoxy method), a Maxam-Gilbert method, etc. or may be carried out using a commercially available sequencing kit such as a Taq dyeprimer cycle sequencing kit or an automated nucleotide sequencer such as a fluorescent

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

7

DNA sequencer. In particular, cDNA libraries constructed from various human tissues (placenta, oral tumors, lung cancers, etc.) or culture cells (human fibrosarcoma HT1080 cell line, human monocytic leukemia U937 cell line, etc.) are screened using the DNA fragment as a probe, and the target DNA can be isolated by sequencing of nucleotide sequences. Preferably, a human placenta cDNA library is screened, a detected DNA is sequenced, and the target DNA is isolated and identified. Labeling of probes, etc. with a radioisotope, etc., may be carried out using a commercially available labeling kit such as a random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim).

[0090] The detailed description thereof is given below.

[0091] The inventors designed and synthesized the following: 5' primer having the following sequence:

[0092] 5P-4 (SEQ ID NO: 3)

SGNVVNGCWGAYATMRTSAT

[0093] wherein S=C or G, N=A, C, G or T, V=A, C, or G, W=A or T, Y=C or T, M=A or C, and R=A or G; mixed bases; and 3' primer having the following sequence:

[0094] 3P-2 (SEQ ID NO: 4)

YTCTSTNCTCTCRAARTGRRHRTCYCC

[0095] wherein Y=C or T, R=A or G, S=C or G, N=A, C, G or T, and H=A, C or T; mixed bases,

[0096] based on highly conserved amino acid sequences GEADILV and GDAHFDDDE, selected from the catalytic enzyme domain among the known MMP family.

[0097] In the above-mentioned sequences, symbols (S, N, V, W, Y, M, R, and H) indicate the incorporation of plural bases, leading to multiple oligonucleotides in the primer preparation. In other words, SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4 are degenerate nucleotide primers.

[0098] Primers can be designed, synthesized, and used based on amino acid sequences in the area specific to the MMP family.

[0099] PCR was carried out using these primers and the cDNA library prepared from a human oral malignant melanoma. The obtained PCR products having a size (90 to 120 b.p.) expected from the primer design were sub-cloned and sequenced. As a result, there was obtained DNA fragments with a novel sequence homologous to the known MMPs, other than PCR products having a sequence identical with either MMP-1 or MMP-9.

[0100] Similarly, by using these primers and cDNA libraries derived from various human cells, PCR products with a novel sequence homologous to the known MMPs may be searched, other than PCR products with the same sequence as that of either MMP-1 or MMP-9.

[0101] The 93 b.p. DNA fragment was employed as a probe to screen for a human placenta cDNA library. As a result, 2.1-kilobase pair DNA fragments were obtained. The obtained DNA fragments were sequenced and the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 was determined.

[0102] The same nucleotide sequence as that represented by SEQ ID NO: 1 does not exist in GENE BANK/EMBL

DNA Data Base. Therefore, it has been recognized that DNA having the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 is absolutely novel.

[0103] The nucleotide sequence of the above mentioned clone possessing a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 has a 3' non-translational sequence together with an open reading frame potentially coding for a 604 amino acid protein. It has been recognized that a deduced signal sequence follows immediately a downstream of the initiation codon and a hydrophobic domain which is composed of aligned 24 amino acid residues with higher hydrophobicity and is characteristic of membrane-type proteins is present at the C-terminal area from the 561st to 584th amino acid residues.

[0104] The novel MMP thus obtained has been named "MT-MMP-3" (the inventors first called it as "MT-MMP-2" in Japanese Patent Application Nos. 7-200319 and 7-200320, both filed on July 14, 1995; however, the inventors has agreed to rename it as "MT-MMP-3", based on the agreements in the conference of Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases (Andover, NH July 16-21, 1995)).

[0105] MT-MMP-3 gene products are confirmed using suitable animal cells, such as COS-1 cells, transfected with the MT-MMP-3 gene. The foreign gene can be introduced into mammal animal cells with known methods in the art or with methods substantially similar thereto, including a calcium phosphate technique (for example, F. L. Graham et al., "Virology", Vol. 52, pp. 456 (1973), etc.), a DEAE-dextran technique (for example, D. Warden et al., "J. Gen. Virol.", Vol. 3, pp. 371 (1968), etc.), an electroporation technique (for example, E. Neumann et al., "EMBO J", Vol. 1, pp. 841 (1982), etc.), a microinjection technique, a liposome technique, a virus infection technique, a phage particle technique, etc.

[0106] Thus, the gene products which were produced by animal cells transfected with the MT-MMP-3 gene were examined by means of immunoprecipitation experiments using monoclonal anti-MT-MMP-3 antibodies. As a result, a 64 kDa protein was immunologically precipitated from the lysate of cells transfected with the MT-MMP-3 gene while no corresponding protein was detected on the culture medium. In other words, it is suggested that MT-MMP-3 gene products are expressed on the cell surface layer without being secreted.

[0107] The MT-MMP-3 protein has been examined for the homology with the reported amino acid sequences of the known MMP family. As shown in FIGS. 1A to 1E, it is revealed that MT-MMP-3 has the highly homology to the known MMP family. The MT-MMP-3 protein maintains the sequence at or near the processing site for conversion of a precursor form to a mature form (corresponding to the sequence conserved in the MMP family) as well as the sequence of the active site best. In addition, the propeptide domain characteristic of the primary structure of MMPs, the Zn binding catalytic domain, the proline-rich hinge domain, and the C-terminal hemopexin coagulation enzyme-like domain are also well conserved in the MT-MMP-3 protein.

[0108] Similarly to MT-MMP-1 (the inventors rename the previously isolated and identified MT-MMP as "MT-MMP-1" in order to distinguish MT-MMP-3 therefrom), MT-

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

8

MMP-3 has a sequence composed of aligned hydrophobic amino acids in the C-terminal region. It is therefore suggested that MT-MMP-3 is a membrane-type MMP. Such a sequence with aligned hydrophobic amino acids does not exist in the other MMP family members. In fact, when fusion proteins in which the aligned sequence composed of the hydrophobic amino acid residues is fused with a secretory protein by genetic engineering are constructed and expressed in culture cells, secretion of the fusion proteins was suppressed and expressed on the cell membranes. As a result, the aligned sequence composed of the hydrophobic amino acids is shown to function as a transmembrane (TM) domain.

[0109] Therefore, it is apparent that MT-MMP-3 gene codes for a novel MMP protein. Consequently, recombinant plasmids produced using MT-MMP-3 gene are all novel recombinant products, and transformants transformed or transfected with the plasmid are novel.

[0110] Any plasmid into which the MT-MMP-3 gene is incorporated may be used as long as said DNA can be expressed in host cells conventionally used in gene engineering techniques (such as procaryotic host cells including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc. and eucaryotic host cells including yeasts, CHO cell, and insect host cells such as Sf21. In such a sequence of the plasmid, it is possible, for example, to incorporate codons suitable for expressing the cloned DNA in selected host cells or to construct restriction enzyme sites. It is also possible to contain control sequences, promotion sequences, etc. for facilitating the expression of the aimed gene; linkers, adaptors, etc. useful for ligating the aimed gene; sequences useful in controlling resistance to antibiotics or in controlling metabolism or in selection; and the like.

[0111] Preferably, suitable promoters may be used. For example, such promoters may include tryptophan (trp) promoter, lactose (lac) promoter, tryptophan-lactose (tac) promoter, lipoprotein (lpp) promoter, λ phage P_L promoter, etc. in the case of plasmids where *Escherichia coli* is used as a host; SV40 late promoter, MMTV LTR promoter, RSV LTR promoter, CMV promoter, SR α promoter, etc. in the case of plasmids where an animal cell is used as a host; and GAL1, GAL10 promoters, etc. in the case of plasmids where yeast is used as a host.

[0112] Examples of the plasmid suitable for host *Escherichia coli* are pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, pSP64, pSP65, pTZ-18R/-18U, pTZ-19R/-19U, pGEM-3, pGEM-4, pGEM-3Z, pGEM-4Z, pGEM-5Zf(-), pBluescript KSTM (Stratagene), etc. Examples of the plasmid vector suitable for expression in *Escherichia coli* are pAS, pKK223 (Pharmacia), pMC1403, pMC931, pKC30, etc. The plasmid for host animal cells may include SV40 vector, polyomavirus vector, vaccinia virus vector, retrovirus vector or the like. Examples of the plasmid for host animal cells are pcD, pcD-SR α , CDM8, pCEV4, pME18S, pBC12BI, pSG5 (Stratagene) or the like. Examples of the plasmid for host yeasts are Ylp vector, YEp vector, YRp vector, YCp vector, etc., including pGPD-2, etc. *Escherichia coli* host cells may include those derived from *Escherichia coli* K12 strains, such as NM533 XL1-Blue, C600, DH1, HB101 and JM109.

[0113] In the case where the host cells are animal cells, they may include COS7 cells, COS-1 cells, and CV-1 cells derived from African green monkey fibroblasts, COP cells,

MOP cells, and WOP cells derived from mouse fibroblasts, CHO cells and CHO DHFR cells derived from chinese hamster, human HeLa cells, C127 cells derived from mouse cells, NIH 3T3 cells derived from mouse cells, etc. The insect cells may include *bombyx mori* larva, *bombyx mori* culture cells such as BM-N cells, etc. wherein *bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus is employed as a vector.

[0114] In the gene engineering techniques of the present invention, it is possible to use various restriction enzymes, reverse transcriptases, DNA modifying and degrading enzymes which are used for modifying or converting a DNA fragment to a structure suitable for cloning, DNA polymerases, terminal nucleotidyltransferases, DNA ligases; etc., which are known or common in the art. Examples of the restriction enzyme are those disclosed in R. J. Roberts, "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, r165 (1985); S. Linn et al. ed., "Nucleases", p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Examples of the reverse transcriptase are those derived from mouse Moloney leukemia virus (MMLV), from avian myeloblastosis virus (AMV), etc. Particularly, RNase H-deficient reverse transcriptase or the like is preferably used. Examples of the DNA polymerase are *Escherichia coli* DNA polymerase, Klenow fragment which is a derivative of *E. coli* DNA polymerase, *E. coli* phage T4 DNA polymerase, *E. coli* phage T7 DNA polymerase, thermophilic bacteria DNA polymerase, etc.

[0115] The terminal nucleotidyltransferase includes TdTase capable of adding a dideoxynucleotide (dNMP) to a 3'-OH terminal, as disclosed in R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983). The enzyme for modifying and decomposing DNA includes exonuclease, endonuclease, etc. Examples of such enzymes are snake venom phosphodiesterase, spleen phosphodiesterase, *E. coli* DNA exonuclease I, *E. coli* DNA exonuclease III, *E. coli* DNA exonuclease VII, λ exonuclease, DNase I, nuclease S1, Micrococcus nuclease, etc. Examples of the DNA ligase are *E. coli* DNA ligase, T4 DNA ligase, etc.

[0116] The vector (or vehicle) which is suitable for cloning DNA genes and constructing DNA libraries includes plasmid, λ phage, cosmid, P1 phage, F factor, YAC, etc. Preferred examples of such vectors are vectors derived from λ phage, such as Charon 4A, Charon 21A, λ gt10, λ gt11, λ DASHIII, λ FIXII, λ EMBL3 and λ ZAPIITM (Stratagene), etc.

[0117] Further, by relying on the nucleotide sequence of MT-MMP-3 gene according to the present invention, equivalent proteins or derivatives (or analogs) thereof wherein the amino acid sequence of MT-MMP-3 is altered may be produced with conventional gene technological methods. Such alterations includes substitution, deletion, insertion, transfer or addition of one or more amino acid residues, etc. Such methods for mutation, conversion, and/or modification may also include those described in Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Kouza 1, Idenshi Kenkyuho II (Lectures on Biochemical Experiments (Second Series; 1), Methods for Gene Study II)", p.105 (Susumu HIROSE), Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1986); Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Shin-Seikagaku Jikken Kouza 2, Kakusan III (Kumikae DNA Gijutsu) (New Lec-

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

9

tures on Biochemical Experiments 2, Nucleic Acids III (Recombinant DNA Technique)", p.233 (Susumu HIROSE), Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol.154, p.350 & p.367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol.100, p.457 & p.468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., "Gene", Vol.34, p.315 (1985); T. Grundstroem et al., "Nucleic Acids Res.", Vol.13, p.3305 (1985); J. Taylor et al., "Nucleic Acids Res.", Vol.13, p.8765 (1985); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol.155, p.568, Academic Press, New York (1987); A. R. Olipliant et al., "Gene", Vol.44, p.177 (1986), etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Examples of such techniques include site-directed mutagenesis (or site-specific mutagenesis) using synthetic oligonucleotides, Kunkel method, dNTP[αS] method (Eckstein method), area-directed mutagenesis using sulfite, nitrite, etc. and the like.

[0118] Further, the proteins thus obtained can be modified chemically for amino acid residues. The protein can also be modified or partially degraded with enzymes such as pepsin, chymotrypsin, papain, bromelain, endopeptidase, exopeptidase or the like to produce a derivative. In addition, the proteins may be expressed as fusion proteins when they are produced using gene recombinant techniques, which are subjected to in vivo and in vitro conversion into and/or processing to those having a biological activity substantially equivalent to native MT-MMP-3. The fusion protein production conventionally used in gene engineering can be employed. Further, such fusion proteins can be isolated and/or purified by means of affinity chromatography or the like wherein the technique employs a fusion portion thereof. The structure of proteins can be modified, improved, etc. by means of methods as described in Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Shin-Seikagaku Jikken Kouza 1, Tanpakushitsu VII, Tanpakushitsu Kougaku (New Lectures on Biochemical Experiments 1, Proteins VII, (Protein Engineering))", Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1993), the disclosures of which are hereby incorporated by reference, or by techniques as described in references cited therein as well as methods substantially equivalent thereto.

[0119] In addition, as described herein below, the biological activity may include those having an immunological activity including an antigenic activity.

[0120] Hence, the present invention relates to proteins wherein one or more amino acid residues may differ from native amino acid residues from the viewpoint of homology, and proteins wherein the positions of one or more amino acid residues may differ from those of native residues. The present invention includes deletion analogs wherein one or more amino acid residues (for example, 1 to 80 residues, preferably 1 to 60 residues, more preferably 1 to 40 residues, further more preferably 1 to 20 residues, particularly 1 to 10 residues, etc.) characteristic of MT-MMP-3 are deleted; substitution analogs wherein one or more amino acid residues (for example, 1 to 80 residues, preferably 1 to 60 residues, more preferably 1 to 40 residues, further more preferably 1 to 20 residues, particularly 1 to 10 residues, etc.) characteristic of MT-MMP-3 are replaced with other amino acid residues; and addition analogs wherein one or more amino acid residues (for example, 1 to 80 residues, preferably 1 to 60 residues, more preferably 1 to 40 residues, further more preferably 1 to 20 residues, particularly 1 to 10

residues, etc.) are added. All of the above mentioned variants or the like are included in the present invention as long as domain structures or C-terminal transmembrane domains commonly characteristic of MMPs are maintained. It is thought that MT-MMP-3 of the present invention may include proteins having a primary structural conformation identical with or substantially equivalent to native MT-MMP-3 or a part thereof. It is also thought that MT-MMP-3 may include proteins having a biological activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP-3. It may be one of mutants (variants) naturally produced or occurred. The MT-MMP-3 according to the present invention can be separated, isolated and purified as described herein below.

[0121] The protein or a salt thereof, which (i) belongs to a member of MMPs having the capability of activating pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP (particularly, MT-MMP-3), and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1; or a partial peptide (or peptide fragment) thereof or a salt thereof is useful and valuable in studies on development and research of enzyme inhibitors using said protein or the like, research and development of medicines, studies on biological phenomenon and reaction with which MT-MMP-3 is thought to be associated, etc. Further, the protein and partial peptide or a salt thereof can be used for production of antibodies thereagainst. The products of the present invention can be used for investigation and research on specific targets to be assayed or measured.

[0122] The present invention also relates to DNA sequences coding for any of the above mentioned polypeptides, MT-MMP-3 polypeptides, and MT-MMP-3 analogs and derivatives, each having all or part of characteristics, unique properties, etc. of native MT-MMP-3.

[0123] The DNA sequences of the present invention provides information concerning the amino acid sequences of the mammal proteins that have not been known so far. Therefore, utilization of the above information is included in the present invention. Such utilization includes design of any of probes for isolating and detecting mammal, in particular human, genomic DNA or cDNA, encoding MT-MMP-3, related (or associated) proteins, etc.

[0124] The DNA sequences of the present invention are useful as probes for isolating and detecting mammal, most preferably human, genomic DNA and cDNA, coding for MT-MMP-3 or related proteins thereof. To isolate genes, PCR techniques or PCR using reverse transcriptase (RT) (RT-PCR) can be used. MT-MMP-3 cDNA and associated DNA thereof can be used in isolating and detecting MT-MMP-3-related genes, via selecting characteristic sequence regions based on amino acid sequences deduced from the cloned and sequenced MT-MMP-3 cDNA sequence, then designing and chemically synthesizing DNA primers, and carrying out PCR, RT-PCR, or any other techniques with the obtained DNA primers.

[0125] Since MT-MMP-3 conserves well the structural characteristics of MT-MMP-1, there is assumed the possibility that MT-MMP-3 also acts as an activating factor for pro MMP-2. Therefore, mammal cells such as COS-1 cells have been cotransfected with a plasmid for expressing pro MMP-2 together with a plasmid for expressing MT-MMP-3. Zymography was carried out for the recollected culture

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

10

medium of the cotransfectants. As a result, a 62 kDa active MMP-2 and a 64 kDa active intermediate have been detected, other than pro MMP-2 which is primarily observed at the position of molecule weight 68 kDa, and the activation of pro MMP-2 depending on the expression of MT-MMP-3 has been observed.

[0126] The expression of MT-MMP-3 mRNA in human tissues has been examined by Northern blotting for various tissue-derived poly (A) RNA. As a result, it has been recognized that MT-MMP-3 mRNA is highly expressed in human lungs, brains, and placentas. However, no expression has been found in human hearts, kidneys, livers, pancreas, and muscle tissues. In studies done by the inventors, the expression of MT-MMP-1 mRNA is significantly high in human lungs, kidneys, and placentas, while lowest in the human brains. These observations show that, although MT-MMP-3 is closely analogous structurally, and functionally in terms of the capability of activating pro MMP-2, to MT-MMP-1, expression of the genes for MT-MMP-3 and MT-MMP-1 in the actual tissues is differently regulated. When the cDNA according to the present invention is employed as a probe, techniques including Northern blotting, Southern blotting, in situ hybridization or the like enable us to detect and/or measure MT-MMP-3 mRNA expression or MT-MMP-3 genes per se in human tissues, which may contribute greatly to applications to studies on diagnosis and treatment of tumors (including cancers) such as diagnosis of the presence and absence of tumor cells, malignancy of cancers, on diagnosis of Alzheimer's diseases, etc.

[0127] According to inventor's investigation results as described herein above, techniques are provided for transferring MT-MMP-3 genes and recombinant DNA molecules into hosts, expressing MT-MMP-3 therein, and isolating and obtaining target MT-MMP-3. Thus, according to the present invention, transformants or transfectants capable of substantially expressing MT-MMP-3 genes and production processes thereof are provided.

[0128] In another aspect, the present invention related to nucleic acids, such as DNA or RNA, which enable us to express

[0129] (i) a protein or a salt thereof, (a) being a member of MMPs capable of activating pro MMP-2 but not MT-MMP-1, and (b) having an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP that is an activator for pro MMP-2,

[0130] (ii) more preferably a polypeptide or a salt (a) having a biological property or a primary structural conformation, identical with or substantially equivalent to MT-MMP-3 or a salt thereof, and (b) having at least part or all of the protein, in a prokaryotic cell such as *E. coli* or an eukaryotic cell such as a mammal cell.

[0131] In addition, such nucleic acids, particularly DNA, may include (a) sequences coding for an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in Sequence Listing or sequences complementary thereto; (b) sequences capable of hybridizing with the DNA sequences (a) or fragments thereof; and (c) sequences having degenerate codons hybridizable with either of the sequences (a) and (b). The unique features of the present invention also reside in transformed prokaryotic cells, such as *E. coli*, and transformed eukary-

otic cells, such as mammal cells, which are transformed with said nucleic acid and can express the polypeptides according to the present invention.

[0132] The present invention further provides antibodies, such as monoclonal antibodies, capable of specifically binding with MT-MMP-3. The antibodies, such as monoclonal antibodies, of the present invention contribute to development and supply of tools useful for researches associated with diagnosis of malignant tumors or cancers, as well as studies on invasion and metastasis of cancers and means useful for researches associated with the crisis mechanism or diagnostic techniques Alzheimer's disease. Such tools and means are within the scope of the present invention.

[0133] The antibody, such as monoclonal antibody, according to the present invention can be produced by immunizing animals with, as an immunogen, human MT-MMP-3 obtained according to the present invention based on techniques known or widely applicable in the art. Examples of such techniques are found in Milstein et al., Nature, 256: 495 to 497, 1975, etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference. In this technique, the antigen used may include any of naturally-occurring (native) MT-MMP-3, recombinant human MT-MMP-3, synthetic peptides having an amino acid sequence composed of at least continuous 8 amino acids which are part of MT-MMP-3, etc. The monoclonal antibody can be labeled using conventional techniques. The labels (markers) may include enzymes, prosthetic molecules, pigment (chromophore) substances, fluorescent substances, chemiluminescent compounds, photoluminescent substances, radioactive substances or the like.

[0134] Described herein below is the production of antibodies.

[0135] It goes without saying that the monoclonal antibody to be used in the present invention may be a monoclonal antibody obtained by utilizing cell fusion techniques with myeloma cells.

[0136] The monoclonal antibody to be used in the present invention can be produced by the following processes:

[0137] 1. Preparation of immunogenic antigens (immunogens)

[0138] 2. Immunization of animals with immunogenic antigens

[0139] 3. Preparation of myeloma cells

[0140] 4. Cell fusion between antibody-producing cells and myeloma cells

[0141] 5. Selection and cloning of hybridomas (hybrid cells)

[0142] 6. Production of monoclonal antibodies

[0143] 1. Preparation of immunogenic antigens

[0144] The antigen used includes naturally occurring MT-MMP-3 and recombinant MT-MMP-3 as prepared according to the present invention. Although MT-MMP-3 may be used after formation of immunogenic conjugates, it can be used to immunize animals after being mixed with a suitable adjuvant without any modifications. Such antigens can be separated, isolated and purified from various sources, for example, antigen-producing sources including cultured

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

11

cells, cultured tissues, transformant cells, etc. by conventional techniques. Such conventional techniques are, for example, salting out such as ammonium sulfate fractionation, etc.; gel filtration on Sephadex™, etc.; ion exchange chromatography using carriers having, for example, a diethylaminoethyl or carboxymethyl group, etc.; hydrophobic chromatography using carriers having, for example, a hydrophobic group such as butyl, octyl, or phenyl, etc.; pigment (or chromophore) gel chromatography; electrophoresis; dialysis; ultrafiltration; affinity chromatography; high performance liquid chromatography; etc. Preferably, the antigen to be used is separated and purified by polyacrylamide electrophoresis, affinity chromatography in which an antibody for specifically recognizing an antigen, such as a monoclonal antibody, is immobilized. Examples of such techniques also include gelatine-agarose affinity chromatography, heparin-agarose chromatography, etc.

[0145] MT-MMP-3 may be fragmented or may include a synthetic polypeptide fragment obtained via selecting specific (or characteristic) sequence areas based on amino acid sequences deduced from the cloned and sequenced cDNA sequences followed by design and chemical synthesis. The fragments may be coupled with various carrier proteins via suitable coupling agents to form immunogenic conjugates such as hapten-proteins. The immunogenic conjugates can be used to design monoclonal antibodies that can recognize only specific sequences. A cysteine residue or the like can be added to the polypeptide thus designed so as to prepare an immunogenic conjugate easily. To fix with a carrier protein or the like, the carrier protein is first activated. This activation may include incorporation of an activated binding group hereinto, etc. The activated binding groups include (1) active ester or active carboxyl groups such as a nitrophenyl ester group, a pentafluorophenyl ester group, a 1-benzotriazol ester group, and an N-succinimide ester group; (2) active dithio groups such as a 2-pyridyldithio group, etc. The carrier proteins include keyhole limpet haemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, globulin, polypeptides such as polylysine, bacterial components such as BCG or the like.

[0146] 2. Immunization of animals with immunogenic antigens

[0147] Animals can be immunized according to techniques as described in Shigeru MURAMATSU et al. ed., "Jikken Seibutsu Gaku Kouza 14, Men-eki Seibutsu Gaku (Lectures on Experimental Biology 14, Immunobiology)", Maruzen K. K., 1985; Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Kouza 5, Men-eki Seikagaku Kenkyuho (Lectures on Biochemical Experiments (Second Series; 5), Methods for Immunological and Biochemical Study)", Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1986); Nippon Seikagaku Kai (Biochemical Society of Japan) ed., "Shin-Seikagaku Jikken Kouza 12, Bunshi Men-eki Gaku III (Kougen-Koutai-Hotai) (New Lectures on Biochemical Experiments 12, Molecular Immunology III (Antigen-Antibody-Complement))", Tokyo Kagaku Dojin, Japan (1992); etc., the disclosures of which are hereby incorporated by reference. The adjuvant to be used with the antigen includes Freund's complete adjuvant, Ribi adjuvant, *Bordetella pertussis* vaccine, BCG, lipid A, liposome, aluminium hydroxide, silica, etc. Immunization is carried out with animals, including mice such as BALB/c. The antigen dose is, for example, approximately 1 to 400 µg/animal for

mice. Generally, the antigen is injected intraperitoneally or subcutaneously into a host animal, followed by additional immunization by repeated courses wherein intraperitoneal, subcutaneous or intravenous administrations are carried out approximately 2 to 10 times at 1- to 4-week intervals, preferably 1- to 2-week intervals. For immunization, BALB/c mice, as well as F1 mice between BALB/c mice and other mice, etc. can be used.

[0148] As required, the degree of animal immunization can be assessed by constructing a system for measuring a titre of antibody and measuring the titre of an antibody. Furthermore, the present invention relates to polyclonal antibodies against MT-MMP-3 and the production thereof using recombinant MT-MMP-3. In this case, the animal used may include mammals, birds or the like. Examples of such animals are cow, horse, goat, sheep, swine, rabbit, mouse, rat, guinea pig, monkey, dog, cat, cock, hen, etc. The antibody may be anti-serum. Also, the antibody may be a higher purified form. For example, its isolation and purification can be carried out in the same manner as the monoclonal antibody described herein below.

[0149] 3. Preparation of myeloma cells

[0150] Immortal cell strains (tumor cell lines) to be used for cell fusion can be selected from non-immunoglobulin-producing cell lines. The cell strains to be used for cell fusion may include, for example, P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunology, 6, 511 to 519, 1976), SP2/0-Ag14 (SP2, Nature, 276, 269 to 270, 1978), mouse myeloma MOPC-21 cell line-derived P3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1 to 7, 1978), P3-X63-Ag8 (x63, Nature, 256, 495 to 497, 1975), P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123, 1548 to 1550, 1979), etc. 8-azaguanine resistant mouse myeloma cell lines can be sub-cultured in a medium for cell culture wherein antibiotics such as penicillin, amikacin or the like, fetal calf serum (FCS) or the like and 8-azaguanine (for example, 5 to 45 µg/ml) are added to a medium for cell culture, such as Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) or RPMI-1640 medium. The specified number of cell lines can be prepared by passing the normal medium two or five days before cell fusion. The cell lines to be used may be cultured on the normal medium after the frozen and preserved strains have been completely thawed at approximately 37° C. and have been washed on the normal medium such as RPMI-1640 three or more times, and the specified number of cell strains may be prepared.

[0151] 4. Cell fusion between antibody-producing cells and myeloma cells

[0152] After animals such as mice are immunized according to the above step 2, their spleens are removed in two to five days from final immunization, and the spleen cell suspension is obtained. In addition to the spleen cells, lymph node cells at various sites of organisms can be obtained and used for cell fusion. The spleen cell suspension thus obtained and the myeloma cell strains obtained by the above step 3 are placed in a medium such as minimum essential medium (MEM), DMEM or RPMI-1640 medium, and an agent for cell fusion, fusogen, such as polyethylene glycol, is added. A widely-used agent for cell fusion can be used, including HVJ: Hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus). Preferably, 0.5 to 2 ml of 30 to 60% polyethylene glycol can be added. Polyethylene glycol with 1,000 to 8,000 in molecule weight can be employed, more preferably,

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

12

polyethylene glycol between 1,000 and 4,000 in molecule weight. The preferred concentration of polyethylene glycol in the fusion medium is between 30 and 60%. As required, a small amount of dimethyl sulfoxide or the like is added to promote fusion. The ratio of spleen cells (lymphocytes) : myeloma cell lines to be used for fusion is preferably 1:1 to 20:1, and preferably falls between 4:1 and 7:1.

[0153] The fusion reaction is conducted for one to 10 minutes, before the addition of a medium such as RPMI-1640 medium. Fusion reaction processing can be done several times. After fusion reaction processing, cells are separated by a centrifuge, then transferred to the selection medium.

[0154] 5. Selection and cloning of hybridomas (hybrid cells)

[0155] The selection media include conventionally known "HAT medium", i.e., PCS-containing MEM, RPMI-1640 medium, etc., supplemented with hypoxanthine, aminopterin, and thymidine. The replacement method for the selection medium is to replenish an amount equivalent to the capacity dispensed to the medium plate on the following day, after which the medium is replaced by half an amount in HAT medium every one to three days. The replacement can be modified depending on situations. Eight to sixteen days after fusion, the medium may be replaced every one to four days with conventionally known "HT medium" wherein aminopterin is excluded from HAT medium. As a feeder cell, for example, mouse thymocyte can be used, which is sometimes effective.

[0156] The supernatant of the culture well with highly growing hybridoma is screened by using MT-MMP-3 or a peptide fragment thereof as an antigen or by using a labeled anti-mouse antibody for measuring target antibodies, with a measuring system such as radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescence immunoassay (FIA) or by the fluorescence activated cell sorter (FACS), etc. The target antibody-producing hybridoma is cloned. Cloning is carried out by picking up colonies in the agar medium or preferably by the limiting dilution. Cloning should be performed several times.

[0157] 6. Production of monoclonal antibodies

[0158] The obtained hybridoma cells are cultured in a suitable growth medium such as FCS-containing MEM, RPMI-1640 medium or the like, and a desired monoclonal antibody can be obtained from the culture supernatant. Large amounts of monoclonal antibodies can be produced by propagating hybridomas as ascites tumors. In this case, each hybridoma is implanted intraperitoneally in a histocompatible animal isogenic to an animal from which the myeloma cell is derived and is propagated. Or each hybridoma can be inoculated, for example, in nude mice, and propagated to produce the monoclonal antibody in the ascites of the animals. The produced monoclonal antibody can be collected from the ascitic fluid and obtained. Prior to implantation of hybridomas, the animal is pretreated intraperitoneally with mineral oils such as pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane). After the preconditioning, the hybridoma can be propagated therein and the ascitic fluid can be harvested. The ascitic fluid can be used as a monoclonal antibody without purification or after purification by conventionally known methods, including salting out such

as precipitation with ammonium sulfate, gel filtration with Sephadex, ion exchange chromatography, electrophoresis, dialysis, ultrafiltration, affinity chromatography, high-performance liquid chromatography, and can be employed. Preferably, the monoclonal antibody-containing ascitic fluid is fractionated with ammonium sulfate and separated and purified by treatments with cationic ion exchange gel such as DEAE-Sepharose, an affinity column such as protein A column, etc. More preferably, it is treated with affinity chromatography with immobilized antigens or antigen fragments (for example, synthetic peptides, recombinant antigen proteins or peptides, portions capable of specifically recognizing the antibody); affinity chromatography with immobilized protein A; etc.

[0159] It is possible to produce antibodies by recombinant DNA techniques wherein the antibody thus obtained in a large amount is sequenced and/or a nucleotide sequence coding for the antibody obtained from the hybridoma cell line is employed.

[0160] These antibodies may be treated with enzymes such as trypsin, papain, pepsin or the like to produce antibody fragments including Fab, Fab', and F(ab')₂ that are occasionally obtained by reduction. These antibody fragments may be occasionally used.

[0161] The antibody to be labeled with a marker may include IgG fractions, and specific bonding fragments Fab' obtainable by reduction after pepsin digestion. The labels include enzymes (peroxidase, alkaline phosphatase, or β -D-galactosidase or the like), chemical substances, fluorescences, radioisotopes, or the like.

[0162] In the present invention, detection and measurement can be carried out by immunostaining including, for example, staining of tissues and cells, immunoassays including, for example, competitive immunoassay and non-competitive immunoassay, radioimmunoassay, ELISA, or the like. The detection and measurement can also be carried with or without B-F separation. Preferably, the detection and measurement is carried out by means of radioimmunoassay, enzyme immunoassay or sandwich assay. In the sandwich-type assay, one of the antibody pair against MT-MMP-3 is detectably labeled. The other antibody capable of recognizing the same antigen is immobilized on a solid phase. Incubation is carried out to sequentially react a sample to be assayed, labeled antibodies, and immobilized antibodies as required. After the non-binding antibodies are separated, the label or marker is detected or measured. The amount of the measured label is proportional to the amount of antigen, i.e., MT-MMP-3. For this assay, simultaneous sandwich assay, forward sandwich assay, or reverse-sandwich assay or the like is called according to the addition sequence of the insolubilized antibody and the labeled antibody. For example, washing, stirring, shaking, filtration, pre-extraction for antigen, etc. is optionally adopted in the measurement process under specific conditions. The other measurement conditions such as specific reagents, concentration of buffering solution, temperature or incubation time can vary according to the elements, such as concentration of the antigens in the sample or the nature of samples to be measured. Any person ordinary skilled in the art can suitably select and determine optimal conditions effective for each measurement while using the general experimentation and perform the selected measurement.

[0163] Various carriers capable of immobilizing antigens or antibodies are available in the art, and they can be arbitrarily and suitably selected in the present invention. For the carrier, various carriers which can be used for antigen and antibody reactions are known. It goes without saying that any well-known carrier can be selected and used in the present invention. Preferred examples are inorganic materials including, for example, glass such as activated glass and porous glass, silica gel, silica-alumina, alumina, magnetized iron, magnetized alloy, etc.; organic high molecular substances including, for example, polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride, polyvinylidene fluoride, polyvinyl acetate, polymethacrylate, polystyrene, styrene/butadiene copolymer, polyacrylamide, cross-linked polyacrylamide, styrene/methacrylate copolymer, polyglycidyl methacrylate, acrolein/ethylene glycol dimethacrylate copolymer, etc., cross-linked albumin, collagen, gelatin, dextran, agarose, cross-linked agarose, natural or modified cellulose such as cellulose, microcrystalline cellulose, carboxymethylcellulose, cellulose acetate and the like, cross-linked dextran, polyamide such as nylon, polyurethane, polyepoxy resin and the like; those obtained by emulsifying polymerization thereof; cells, erythrocytes and the like; and those into which a functional group may be introduced, as required, by using a silane coupling agent.

[0164] Also included are solid materials such as filtration paper, beads, inner wall of test container such as test tube, titer plates, titer wells, glass cells, cells made of synthetic materials such as plastic resin cells, glass rods, rods made of synthetic materials, rods thickened or thinned at the end, rods whose end is round or flat, and thin-plated rods.

[0165] Antibodies can be coupled with these carriers, and preferably the monoclonal antibodies according to the present invention which are capable of specifically binding with MT-MMP-3, can be coupled therewith. Coupling between the carrier and those associated with these antigen-antibody reactions can be carried out by techniques including physical method such as adsorption; a chemical method using a coupling agent, etc. or an activated reactant; a method using a chemically interactional coupling.

[0166] The label may include enzyme, enzyme substrates, enzyme inhibitors, prosthetic groups, coenzymes, enzyme precursors, apoenzymes, fluorescent substances, pigments, chemical luminescent compounds, light-emitting substances, coloring substances, magnetic substances, metal particles such as gold colloids, radioactive substances and the like.

[0167] The enzyme may include oxidation-reduction enzymes such as dehydrogenase, reductase, and oxidase; transferases that catalyze the transfer of an amino, carboxyl, methyl, acyl, phosphate group or the like; hydrolases that hydrolyze an ester, glycoside, ether, peptide bond or the like; lyase; isomerase; ligase; and the like. Plural enzymes can be used in a conjugated form for detection (for example, enzymatic cycling may also be utilizable).

[0168] Typical radioactive isotopes for the label include [^{32}P], [^{125}I], [^{131}I], [^3H], [^{14}C], [^{35}S], and the like.

[0169] Typical enzymes for the label include peroxidases such as horseradish peroxidase; galactosidase such as *E. coli* β -D-galactosidase; maleate dehydrogenase; glucose-6-phosphate dehydrogenase; glucose oxidase; glucoamylase; ace-

tylcholine esterase; catalase; alkaline phosphatase such as calf intestinal alkaline phosphatase and *E. coli* alkaline phosphatase, and the like.

[0170] In the case where alkaline phosphatase is used, fluorescence or emitted light can be measured by using a substrate such as umbelliferone derivatives including 4-methylumbelliphenyl phosphate; phenol phosphate derivatives including nitrophenyl phosphate; enzymatic cycling systems utilizing NADP; luciferin derivatives; dioxetane derivatives; and the like. It is also possible to use a luciferin/luciferase system.

[0171] When catalase is used, the reaction takes place with hydrogen peroxide to produce oxygen which can be detected with an electrode or the like. The electrode may be a glass electrode, an ionic electrode using an insoluble salt membrane, a liquid-membrane type electrode, a polymer membrane electrode and the like.

[0172] It is possible to replace the enzyme label with a biotin label and an enzyme-labeled avidin (streptoavidin). For the label, a plurality of many different kinds of labels or markers can be used. In this case, it is possible to perform plural measurements continuously or discontinuously and/or simultaneously or separately.

[0173] According to the present invention, a signal can be formed by using a combination of 4-hydroxyphenylacetic acid, 1,2-phenylenediamine, tetramethylbenzidine, or the like with horseradish peroxidase, by using a combination of umbelliferone galactoside, nitrophenyl galactoside, or the like with enzyme reagents such as β -D-galactosidase and glucose-6-phosphoric acid dehydrogenase. There can be further used those that are capable of forming a quinol compound such as hydroquinone, hydroxybenzoquinone or hydroxyanthraquinone, a thiol compound such as lipoic acid or glutathione, phenol derivatives or ferrocene derivatives by utilizing the action of enzymes.

[0174] The fluorescent substance and chemiluminesce compounds may include fluorescein isothiocyanate, Rhodamine derivatives such as Rhodamine B isothiocyanate, and tetramethyl Rhodamine isothiocyanate, dansyl chloride (5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonyl chloride), dansyl fluoride, fluorescamine (4-phenylspiro[3.3]hept-2,6-dione), 1'-[3-(H)-isobenzofuran]-3,3'-dione, phycobiliprotein, acridinium salts, luminol compounds such as lumiferin, luciferase, and aequorin, imidazole, oxalic acid ester, rare earth chelate compounds, coumarin derivatives, etc.

[0175] The labelling can be accomplished by utilizing the reaction of a thiol group with a maleimide group, reaction of a pyridyldisulfide group with a thiol group, the reaction of an amino group with an aldehyde group, etc. Additionally, it can be selected from widely known methods, methods that can be easily put into practice by an artisan skilled in the art, or any of methods modified therefrom. The coupling agents used for producing the foregoing immunoconjugate or for coupling with carriers are also applicable and usable.

[0176] The coupling agents include, for example, glutaraldehyde, hexamethylene diisocyanate, hexamethylene diisothiocyanate, N,N'-polymethylene bisiodoacetamide, N,N'-ethylene bismaleimide, ethylene glycol bis succinimidyl succinate, bisdiazobenzidine, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), N-succinimidyl 4-(N-

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

14

maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), N-sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate, N-succinimidyl 4-(iodoacetyl)-aminobenzoate, N-succinimidyl 4-(1-maleimidophenyl)butyrate, N-(E-maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS), iminothiolane, S-acetylmercaptosuccinic anhydride, methyl-3-(4'-dithiopyridyl)propionimide, methyl-4-mercaptobutyrylimide, methyl-3-mercaptopropionimide, N-succinimidyl-S-acetylmercaptoacetate, etc.

[0177] According to the measurement of the present invention, substances to be measured can be made to react sequentially with labeled antibody reagents such as monoclonal antibodies labeled with enzymes or the like, and with antibodies coupled (immobilized) on a carrier, or all the members can be reacted each other simultaneously. The sequence of adding reagents (members) may vary depending on the type of carrier system selected. In the case where beads such as sensitized plastics are used, the labeled antibody reagents such as monoclonal antibodies labeled with enzymes or the like are first put in a suitable test tube, together with a sample including substances to be measured, followed by addition of the plastic beads. Measurement can be then carried out.

[0178] For quantitative measurements according to the present invention, the immunological measurement is applied. For the measurement, the solid phase carriers used may include various materials and shapes which can be selected from balls, microplates, sticks, microparticles, test tubes, and the like, made of polystyrene, polycarbonate, polypropylene, polyvinyl and other materials capable of adsorbing proteins such as antibodies.

[0179] The measurement can be carried out in a suitable buffer system so as to maintain in optimal pH (for example, between pH about 4 and about 9). In particular, the preferred buffers may include acetate buffer, citrate buffer, phosphate buffer, tris buffer, triethanolamine buffer, borate buffer, glycine buffer, carbonate buffer, tris-hydrochloride buffer, etc. The buffers can be used optionally in a mixed form at an arbitrary rate. Preferably, the antibody and antigen reaction is carried out at a temperature between about 0 and 60° C.

[0180] The antibody reagents (for example, monoclonal antibodies labeled with enzymes), the reagents such as antibodies immobilized on (coupled to) a carrier, and substances (samples) to be measured can be incubated until equilibrium is reached. However, the reaction can be stopped after limited incubation by separating the solid phase from the liquid phase at a time well before the antibody/antigen equilibrates, and the degree of the presence of markers such as enzymes in either of the liquid and solid phases can be measured. Measurement operation can be performed by using automated measuring instruments, and data can be measured by permitting a substrate to be converted by the action of enzymes and by detecting produced indication signals with a luminescence detector, a photo detector or the like.

[0181] In the antibody/antigen reaction, adequate means can be taken so as to stabilize reagents to be used, substances (samples) to be measured, and labels (markers) such as enzymes, respectively, and/or to stabilize antibody/antigen

reactions per se. Further, for eliminating non-specific reaction, reducing inhibitory influences acting thereon, and/or activating measurement reaction, proteins, stabilizers, surfactants, chelating agents or the like can be added to solutions which are incubated. The chelating agent is more preferably ethylenediamine tetraacetate (EDTA). The blocking techniques for preventing non-specific binding reaction, which techniques are generally employed in the art or well-known among the persons skilled in the art, may be employed. The blocking can be achieved by treatments with normal serum proteins, albumin, skim milk or the like from mammals, etc., fermented milk products, collagen, gelatin, or the like. These methods or techniques can be used without any limitation since the purpose is to prevent non-specific binding reaction.

[0182] The samples to be measured according to the present invention may include various types of solutions such as colloid solution, non-fluid samples and the like. Preferably, the samples are biological samples including, for example, blood, serum, plasma, articular fluid, cerebrospinal fluid, saliva, amniotic fluid, urine, any other humoral fluids, cell culture liquids, tissue culture liquids, tissue homogenate, biopsy samples, tissues, cells and the like.

[0183] It should be understood that the DNA of the present invention can be treated in the similar manner as the foregoing antibodies (for example, the DNA can be labeled by well-known techniques or substantially equivalents thereto, and can be used for measurements or assays).

[0184] By utilizing the foregoing various preferred embodiments according to the present invention, there can be provided diagnostic means useful for researches regarding diagnosis or therapy of cancers (malignant tumors), including diagnosis of the presence or absence of tumor cells, estimation of malignancy of cancers and tumors as well as a variety of technological means to be applied to the other medical and physiological applications.

[0185] By referring to the working examples, the present invention is described below in detail. It should be understood that the present invention is not limited to such examples and a variety of preferred embodiments within the spirit of this specification are enabled.

[0186] In the case where nucleotides (bases), amino acids or the like are indicated by abbreviations in the specification and in the drawings, they must conform with an "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" or are based on the meanings of the terms which are commonly used in the art. When optical isomers are present in amino acids, an L-isomer is referred to unless otherwise specified.

[0187] The transformant *Escherichia coli*, designated NM533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2), obtained in Example 1 (e) mentioned herein below has been deposited as from July 5, 1995 (original deposit date) with the National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH), Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japan, located at 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI (zip Code: 305), JAPAN and has been assigned the Accession Number FERM P-15033. The original deposit of the transformant *E. coli* NM533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2) has been transferred to one under the Budapest Treaty by a request dated Jul. 1, 1996 and is on deposit with the Accession Number FERM BP-5573 under the terms of the Budapest Treaty at NIBH.

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

15

[0188] The mouse-derived monoclonal anti-human membrane-type matrix metalloproteinase-3 (MT-MMP-3) antibody producing hybridoma, designated 117-4E1, obtained in Example 3 (f) to (h) mentioned herein below has been deposited as from Jul. 5, 1995 (original deposit date) with NIBH and has been assigned the Accession Number FERM P-15031. The original deposit of the hybridoma 117-4E1 has been transferred to one under the Budapest Treaty by a request dated July 1, 1996 and is on deposit with the Accession Number FERM BP-5572 under the terms of the Budapest Treaty at NIBH.

EXAMPLES

[0189] Described below are examples of the present invention which are provided only for illustrative purposes, and not to limit the scope of the present invention. In light of the present disclosure, numerous embodiments within the scope of the claims will be apparent to those of ordinary skill in the art.

Example 1

[0190] Isolation of Novel Metalloproteinase (MT-MMP-3) cDNA Isolation of novel MMP cDNA is basically carried out according to the following methods:

[0191] 1) Degenerate primers were synthesized based on the conservative sequences in an MMP family. Screening for cDNA derived from human tissues was carried out, and PCR products were obtained. 2) The obtained partial clones were used as probes, and full length cDNA was screened from cDNA libraries.

[0192] (a) Construction of cDNA Libraries

[0193] Total RNA extracts from various human tissues (placenta, oral cancers, lung cancers or the like) or cultured cells (human fibrosarcoma cell HT1080, human monocytic leukemia cell U937 or the like) can be used as RNA sources in producing cDNA libraries. mRNA samples derived from an oral malignant melanoma were used as starting materials in Example 1.

[0194] Extraction of total RNA from the tissues was carried out according to the guanidine-cesium chloride technique (Biochemistry, 18: 5294 to 5299, 1979), and the total RNAs thus obtained was purified using oligo(dT) cellulose column to afford poly (A)⁺mRNA. cDNA was synthesized according to the Gubler & Hoffman's method (Gene, 25: 263 to 269, 1983). The purified poly (A)⁺ mRNA as a template was treated with SuperScriptTM reverse transcriptase (Stratagene) using, as primers, random hexamers or oligo dT to synthesize first-strand cDNA. The first strand cDNA product was treated with RNase H, followed by treatment with *E. coli* DNA polymerase I, whereby second strand cDNA was synthesized to form double-stranded cDNA. For the synthesis of first strand cDNA, a mixture of 5 μ l of poly A⁺mRNA fraction samples, 2 μ l of random hexamers (80 μ M), and 4.5 μ l of reaction buffer solution was incubated for 10 minutes at 70° C. and ice-cooled. To the reaction mixture were added 4 μ l of 5 \times reaction buffer solution, 2 μ l of 0.1M dithiothreitol (DDT), 1 μ l of 10 mM dNTPs and 1 μ l of RNase inhibitor. The mixture was well mixed, to which 0.5 μ l (approximately 100 units) of SuperScriptTM reverse transcriptase (GIBCO BRL) was added. The resultant mixture was incubated for one hour at 37° C.,

and then for 10 minutes at 70° C. The synthesis of the second chain of cDNA can be similarly processed and carried out.

[0195] Construction of cDNA libraries can be carried out, for example, using λ gt11. The synthesized double strand cDNA was blunted with T₄ DNA polymerase, followed by methylation of EcoRI site existing in the cDNA with EcoRI methylase. The cDNA was ligated with EcoRI linker d(pG-GAATTCC) by T₄ DNA ligase, and digested with EcoRI to construct cDNA having both EcoRI ends. The resulting cDNA was cloned into EcoRI site of λ gt11. Then, the cDNA was packaged by an in vitro packaging kit, and cDNA libraries were constructed. A variety of commercially available human tissue-derived cDNA libraries (CLONTECH) can be used directly herein.

[0196] (b) Amplification of Novel MMP cDNA Fragments

[0197] A polymerase chain reaction (PCR) with Taq DNA polymerase was carried out using the obtained cDNA as a template and degenerate primers synthesized based on the amino acid sequences conserved in the MMP family. PCR amplification of novel MMP cDNA fragments was done using, for example, methods as described in R. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1985); PCR Technology, Stockton Press, etc.

[0198] One μ l of the reaction product obtained in the above process as a template, 5 μ l of 10 \times PCR buffer solution, 1 μ l of 25 mM dNTPs, 1 μ l of primers for amplification, and 1 unit of Taq polymerase was mixed together with sterile distilled water such that the total amount was 50 μ l. This reaction mixture was subjected to PCR amplification with 30 cycles wherein one cycle includes 93° C. for one minute, 55° C. for one minute, and 72° C. for one minute.

[0199] The degenerate primers were designed and synthesized as follows:

[0200] GEADIMI (corresponding to Gly¹⁵⁵ to Ile¹⁶¹ of MMP-1, Gly¹⁶⁵ to Ile¹⁷¹ of MMP-2, Gly¹⁵⁵ to Ile¹⁶¹ of MMP-3, Gly¹⁵⁰ to Ile¹⁵⁶ of MMP-7, Gly¹⁵⁴ to Ile¹⁶⁰ of MMP-8, Arg¹⁶² to Ile¹⁶⁸ of MMP-9, Gly¹⁵⁴ to Ile¹⁶⁰ of MMP-10, Gly¹⁵¹ to Ile¹⁵⁷ of MMP-11, and Gly¹⁵⁵ to Val¹⁶¹ of MMP-12, respectively; numbering of amino acid residues is according to FIGS. 1A to 1E), and GDAHFDDE (corresponding to Gly¹⁹² to Glu²⁰¹ of MMP-1, Gly²⁰³ to Glu²¹¹ of MMP-2, Asn¹⁹² to Glu²⁰¹ of MMP-3, Gly¹⁸⁷ to Glu¹⁹⁶ of MMP-7, Gly¹⁹¹ to Glu²⁰¹ of MMP-8, Gin¹⁹⁹ to Glu²⁰⁸ of MMP-9, Tyr¹⁹¹ to Glu²⁰⁰ of MMP-10, Glu to Glu¹⁹⁷ of MMP-11, and Gly¹⁹² to Glu²⁰¹ of MMP-12, respectively; numbering of amino acid residues is according to FIGS. 1A to 1E) were selected as well conserved amino acid sequences from the catalytic domains among the known MMP family members (each amino acid residue in the sequences served as primers is represented by a standard single character symbol). Based on above amino acid sequences, the degenerate oligonucleotide primers for 5'-primer (5'-primer: 5P-4) of the following sequence:

[0201] (SEQ ID NO: 3)

[0202] 5'-(C or G)G(A, C, G or T)(A, C or G)(A, C or G)(A, C, G or T)GC(A or T)GA(C or T)AT(A or C)(A or G)T(C or G)AT-3'

[0203] and 3'-primer (3'-primer: 3P-2) of the following sequence:

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

16

[0204] (SEQ ID NO: 4)

[0205] 5'-(C or T)TC(A or G)T(C or G)(A, C, G or T)TC(A or G)TC(A or G)AA(A or G)TG(A or G)(A or G)(A, C or T)(A or G)TC(C or T)CC

[0206] were synthesized according to β -cyanoethylphosphoamidite techniques with a DNA synthesizer: Model 392 (Applied Biosystems).

[0207] In the above-mentioned sequences, the parentheses indicate the incorporation of a plurality of bases, leading to multiple oligonucleotides in the primer preparation. The plural bases in parentheses were incorporated in the presence of a mixture of plural bases upon synthesis.

[0208] Upon the synthesis, a BamHI site was introduced onto the 5'-end of the primer: 5P-4, and an EcoRI site onto the 3'-end of the primer: 3P-2. The obtained primers 5P-4 and 3P-2 were purified with a Nick column (Pharmacia) equilibrated with a 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 6.8). Absorption at 260 nm was measured and the primer solution was made to 20 / M.

[0209] The obtained PCR products were separated with 10% agarose electrophoresis. Seven types of PCR products with predicted sizes (90 to 120 base pairs) from a set of the primers used were extracted and purified. Each purified PCR product was treated with BamHI and EcoRI, followed by subcloning into, for example, the BamHI, EcoRI site of a suitable plasmid such as pBluescript™ or pUC18. For example, 10 μ l of PCR products were separated and confirmed by means of 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and approximately 120 to 130 bp PCR products were subcloned into a plasmid pBluescript™ vector. A reaction mixture of 1 μ l of PCR products, 1 μ l of 10 \times ligation buffer solution, 2 μ l of resuspended vector solution and 1 μ l of T4 DNA ligase were incubated at 12° C. overnight. The obtained recombinant vector was introduced into suitable competent cells (for example, competent *E. coli* HB101 and competent XL1-Blue can be used) and subcloned in accordance with the protocols of a TA Cloning Kit (Invitrogen). Additionally, vectors such as pUC119 and pCR™ can be used. The nucleotide sequences of the cloned PCR products were sequenced using a fluorescent DNA sequencer Model 373A (Applied Biosystems) and a Taq dyeprimer cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

[0210] The nucleotide sequences of these seven isolated and sequenced PCR products were compared with the nucleotide sequences of the known MMP members. As a result, two of the seven cloned cDNA fragments matched a portion of the already reported nucleotide sequence of MMP-2 (J. Biol. Chem., 261: 6600 to 6605, 1986) and the one matched a part of the nucleotide sequence of MMP-9 (J. Biol. Chem., 264: 17213 to 17221, 1989). Among four other PCR products, two cloned cDNA fragments were the nucleotide sequence irrelevant to MMPs; however, the remaining two were 93 bp, have the same sequence each other and conserve the deduced amino-acid sequence showing homology to the reported MMP genes. For convenience, this PCR product was named "MMP-X2 fragment".

[0211] (c) Screening of Novel MT-MMP-3 Genes from cDNA Library and Sequencing

[0212] Twenty-five ng of MMP-x2 fragments (cDNA fragments) obtained in the foregoing (b) were labeled with

[α -³²P] dCTP (Amersham), for example, using a random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim), thereby the obtained probe having a specific activity of 2 to 5.0 CPM/ μ g. This was used as a probe for screening for cDNA libraries derived from various human tissues and cells.

[0213] Host cells, *E. coli* Y1090, were infected with human oral malignant melanoma CDNA libraries constructed in A gtlI as described in the above (a) at a concentration of 4 \times 10⁴ plaque forming units/15 cm² plate to form plaques. The *E. coli* Y1090 cell was first cultured in a L medium containing 0.02% maltose overnight, collected, and then suspended in 10 mM MgSO₄. This cell suspension was mixed with a phage solution and the resultant mixture was incubated at 37° C. for 15 min. to allow the adsorption of phages on host cells. The infected cells were spread on 15 cm L plates prepared in advance by addition of soft agar. The plates were incubated at 42° C. overnight to form plaques. Then a nylon filter (for example, Hybond-N: Amersham, etc.) or nitrocellulose filter (for example, HATF: Millipore, etc.) was placed on the plate and was allowed to stand for about 30 seconds. The membrane (filter) was gently removed and dipped in an alkali denaturing solution (0.5 M NaOH and 1.5 M NaCl) for 1 min., and then in a neutralizing solution (0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8) containing 1.5 M NaCl) for 15 min. This filter was washed with 2 X SSPE (0.36 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, and 2 mM EDTA), and then was air-dried. Transfer of the plaques to filters was repeated, and at least two filters were replicated. However, the contact time for the second and subsequent filters with the plates was extended to approximately 2 minutes.

[0214] These filters were baked at 80° C. for two hours to fix DNAs thereon. At least two filters prepared from a single plate were rinsed with a washing solution (50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1M NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) at 42° C. for an hour, respectively, then placed into a bag for hybridization and dipped in a prehybridization solution (50% formamide, 5 \times Denhardt's solution (0.2% bovine serum albumin, 0.2% polyvinylpyrrolidone), 5 X SSPE, 0.1% SDS, 100 P g/ml thermally-denatured salmon sperm DNA), followed by prehybridization at 42° C. for 6 to 8 hours. Next, to the prehybridization solution was added the ³²P-labeled probe described in the above (c) which was thermally denatured at 100° C. for 5 min., and hybridization was carried out at 42° C. overnight. After completion of hybridization, the filters were rinsed in a large amount of 2 X SSC solution containing 0.1% SDS at room temperature. Next, the filters were placed in a 0.2 X SSC solution containing 0.1% SDS at 55° C. for 30 min. After this treatment was repeated twice, the filters were air-dried. Then each filter was put on an X-ray film (Kodak XR) and autoradiography was carried out at -80° C. for 12 hours. The X-ray films were developed. Two films obtained from a single plate were superposed, and overlapping signals were marked. Plaques corresponding to the marked signals were picked up and suspended in an SM solution (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 100 mM NaCl and 10 mM MgSO₄). This phage suspension was suitably diluted, preferably diluted at a concentration of 10 to 100 plaque forming units/10 cm² plate, and plated on 10 cm² plates on which *E. coli* was cultured. Then screening was carried out in the same manner as above, and recombinant phages were obtained.

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

17

[0215] (d) Preparation of Recombinant λ gt11 DNA Having Novel MT-MMP-3 Gene

[0216] The cloned phages were plated respectively in the same manner as that described in the foregoing (c), and incubated at 42° C. for 3 hours, and then at 37° C. overnight. To the SM solution were added several drops of chloroform, and the plates were allowed to stand at room temperature for 30 min. A plug of soft agar in the upper layer was obtained by scratching together with the SM solution, followed by centrifugation. To the centrifuged supernatant was added polyethylene glycol-6000 (PEG-6000) until a final concentration of 10% was reached, the mixture was stirred, and allowed to stand at 4° C. for 1 hour. This was centrifuged, the supernatant was discarded, and phage particles were recollected. The phage particles were suspended in a SM solution and purified by glycerol-gradient ultracentrifugation (Molecular cloning, a laboratory manual, Ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory, 2nd Ed. 78, 1989). The obtained phages were suspended in a TM solution, and treated with DNase I and RNase A, to which then was added a mixture of 20 mM EDTA, 50 μ g/ml Proteinase K, and 0.5% SDS. The mixture was incubated for 1 hour at 65° C. The resultant mixture was extracted with phenol, then with diethyl ether, and precipitated with ethanol to afford DNA. The obtained DNA was washed with 70% ethanol, dried, and dissolved in a TE solution (10 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 10 mM EDTA).

[0217] (e) Sequencing of Inserts

[0218] The λ gt11 DNA prepared in the foregoing (d) was cleaved with EcoRI. The inserts were separated and purified, then subcloned into the EcoRI site of a vector pBluescriptTM (Stratagene). Host cells, *E. coli* NM533 XL1-Blue, were transformed with this recombinant pBluescript. After selection of the transformed cells, the cells were infected with helper phages, VCSM13 (Stratagene), and cultured overnight. The cultured medium was centrifuged to remove bacterial cells, and PEG/NaCl was added to this medium to precipitate phages. The precipitate was suspended in a TE solution, then extracted with phenol and precipitated with ethanol to recover single strand DNAs. The single strand DNA was sequenced using a fluorescent DNA sequencer Model 373A (Applied Biosystems) and a Taq dyeprimer cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The sequenced full-length nucleotide sequence was 2107 base pairs, and described in SEQ ID NO: 1 of the Sequence Listing. For the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, a matching sequence was checked using GENBANK/EMBL DNA Data Base; however, there exists no same sequence. It has been recognized that an open reading frame potentially encoding a putative 604-amino acid protein is present in this approximately 2.1-kilobase pair DNA sequence, of which amino acid sequence is shown in SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing. The deduced protein has been named "MT-MMP-3". The obtained DNA fragments can be incorporated into vectors including plasmids, such as PEX, pMEMneo, or pKG and can be expressed in host cells such as *E. coli* or CHO cells.

[0219] The *Escherichia coli*, designated NM533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2), harboring a vector (p S^{57M} (Stratagene)) into which a nucleotide sequence coding for the above MT-MMP-3 is incorporated has been deposited as from Jul. 5, 1995 (original deposit date) with NIBH and has

been assigned the Accession Number FERM P-15033. The original deposit of the transformant *E. coli* Nm533 XL1-Blue (XL1-Blue/MMP-X2) has been transferred to one under the Budapest Treaty by a request dated Jul. 1, 1996 and is on deposit with the Accession Number FERM BP-5573 under the terms of the Budapest Treaty at NIBH.

[0220] (f) Amino Acid Sequence Analysis of MT-MMP-3

[0221] FIGS. 1A to 1E show an alignment when the amino acid sequence (described in SEQ ID NO: 2 in Sequence Listing) deduced from the MT-MMP-3 nucleotide sequence (described in SEQ ID NO: 1 in Sequence Listing) is compared with the known amino acid sequences of MMP members. The amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2 in Sequence Listing shows high homology to the MMP family, and conserves well a characteristic domain structure of the MMP family, i.e., a signal peptide removable during secretion and production, a propeptide domain, a catalytic domain, a hinge domain, and a hemopexin-like domain. In particular, PRGVPD, which is the most conservative sequence among the MMP family members and positioned at or near a cleavage site for converting a pro form into an active form, is conserved completely in MT-MMP-3, and the sequence of an active domain is also highly conservative. Comparison of MT-MMP-3 with the other known MMP family members for the amino acid sequences of the active domain including a Zn²⁺-binding site, reveals that the homology of MT-MMP-3 protein is the highest to MT-MMP-1 (66%) and significantly to others, including MMP-12 (51%), MMP-2 & MMP-9 (50%, respectively), MMP-1 (49%), MMP-3 (48%), MMP-8 (47%), MMP-11 (46%), and MMP-7 (44%).

[0222] In addition, MT-MMP-3 has three characteristic insertions compared with the other MMP family members. They are the 11-amino acid insertion, GSKFHRRKR (IS-1: Gly¹⁰⁹ to Arg¹¹⁹ of SEQ ID NO: 2), between a propeptide domain and a catalytic domain, the 8-amino acid insertion, PYSELENG (TS-2: Pro¹⁷¹ to Gly¹⁷⁸ of SEQ ID NO: 2), in the catalytic domain, and the 75-amino acid insertion (IS-3: Asp⁵³⁰ to Val⁶⁰⁴ of SEQ ID NO: 2) containing the continuous transmembrane-like 24-hydrophobic amino acid sequence, AIAIVIPCILALCLLVVYTVFQF. Such three insertion sequences are present only in MT-MMP-1 among the MMP family members but not recognized in the other MMPs. With regard to three insertion sequences in MT-MMP-3, the number and position of constituting amino acid residues thereof is almost same as in MT-MMP-1; however, the amino acid composition thereof is clearly different from that of MT-MMP-1, and IS-3 has 37% homology to that in MT-MMP-1. Incidentally, the homology of entire sequences is 43%. A similar sequence to the first insertion IS-1 is exceptionally present in MMP-11; however, the RXKR sequence conserved in IS-1 is a potential processing region for subtilisin-like enzymes, and it is known that the amino acid sequence RXKR is the subtilisin-like protease-cleavage site of various eucaryotic secretory proteins (J. Biol. Chem., 266: 12127 to 12130, 1991). The continuous sequence composed of hydrophobic amino acids in IS-3 is believed to be a transmembrane (TM) domain (TM is specifically characteristic of MT-MMP-1 (J. Biol. Chem.: 270, 801 to 805, 1995)). Thus, the continuous sequence of hydrophobic amino acids existing in IS-3 of MT-MMP-3 is also expected to be a transmembrane domain (see: Example 5). The amino acid sequence encoded by MT-MMP-3cDNA

isolated according to the present invention is highly homologous to the other MMP family and is similar to MT-MMP-1 previously discovered by the present inventors; however, it is obviously different in the detailed points and differed in molecule weight. The protein of the present invention has a molecule weight of approximately 69 kDa.

[0223] These features on the sequences suggest that MT-MMP-1 and MT-MMP-3 form a sub-family in the MMP family.

Example 2

Expression of MT-MMP-3 mRNA

[0224] (a) Expression in Human Tissues

[0225] Northern blotting was carried out by using the membrane, Human Multiple Tissue Northern Blots (Clontech) onto which poly (A) RNA samples derived from human tissues such as heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, kidney, and pancreas were applied and by using as a probe the ³²P-labeled 2.1 kb cDNA as described in Example 1 (e). Labeling of the probe was done in the same manner as in Example 1 (c). Multiple Tissue Northern Blots filters wetted with 3 X SSC (0.45 M NaCl, 0.045 M trisodium citrate 2H₂O, pH7.0) were dipped in 10 ml of pre-hybridization solution (0.75M NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.5 X Denhardt's solution, 50% formamide, and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 1% SDS). Pre-hybridization was carried out at 42° C. for two or three hours with gently stirring. Next, the pre-hybridization solution was exchanged with a solution obtained by addition of heat-denatured probes to 10 ml of hybridization solution (in which 10% sodium dextran and 20u g/ml denatured salmon sperm DNA were added to a pre-hybridization solution). Hybridization was carried out at 43° C. overnight. After completion of hybridization, the filters were washed with a 2 X SSC solution containing 0.1% SDS.

[0226] Next, the blots were placed in a 1 X SSC solution containing 0.1% SDS at 55° C. for 30 min. The blots were traced with a Bioimage Analyzer BAS1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.), and expression intensities of mRNAs in each tissue was assessed. At this time, the same blots were probed with P-labeled glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (CLONTECH) for using as a mRNA internal standard.

[0227] The results are shown in FIG. 2A. The size of MT-MMP-3 mRNA is 12 kb in any tissue. Among the tissues examined, a band specific MT-MMP-3 cDNA probe was detected in lung, brain, and placenta, with high expression; however, it was undetectable in the heart, kidney, liver, pancreas, and skeletal muscle.

[0228] On the other hand, when northern blotting was carried out by using Human Multiple Tissue Northern Blots (Clontech), and using as a probe P-labeled MT-MMP-1 cDNA, MT-MMP-1 mRNA detected at 4.5 kb was significantly expressed in lung, kidney, and placenta. The lowest expression occurred in the brain. Cross-hybridization of MT-MMP-1 and MT-MMP-3 was not generated.

[0229] (b) Expression in Cultured Tumor Cells

[0230] The expression of MT-MMP-3 mRNA in various cultured human tumor cell lines was examined. The human

tumor cell lines used were larynx carcinoma-derived Hep2 cell, bladder carcinoma-derived T24 cell, lung carcinoma-derived PC-3 cell, stomach tumor-derived cells KKLS, NKPS, and MKN-28, osteosarcoma-derived cells SK-ES-1 and U-20S, squamous cell carcinoma-derived OSC-19, and malignant melanoma A375 cell. The fibroblasts used were human embryonal lung-derived fibroblasts HEL.

[0231] RNA samples extracted from each cells (10 µg per sample) were dissolved in 2% MOPS (pH 7.5) containing 50% formamide and 17.5% formalin and reacted at 65° C. for 10 min. The products were applied to 1% agarose gel electrophoresis in 2% MOPS. After electrophoresis, the gel was transferred onto a nylon membrane (for example, Hybond-N, Amersham). After the transfer, the membrane was fixed by irradiating ultraviolet rays with 254 nm in wavelength by 1200 micro Joule. The blots were hybridized with ³²P-labeled cDNA for 16 hours in the same manner as in the foregoing (a), and were traced with a Bioimage Analyzer BAS1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.). Signals were detected and their intensity was assessed.

[0232] MT-MMP-3 mRNA was detected in bladder carcinoma T24 and larynx carcinoma Hep2 cells with higher expression than in the other cells. However, the expression of MT-MMP-1 mRNA was at low levels in these cells.

[0233] On the other hand, in OSC-19 cells and HEL cells in which the significant expression of MT-MMP-1 mRNA was detected, the expression level of MT-MMP-3 mRNA was lower than in other cells (FIG. 2B).

[0234] Although MT-MMP-1 and MT-MMP-3 have, from the comparison of the amino acid sequences, a quite similar domain structure and have the same action on activating pro MMP-2 (see: Example 6), expression of the genes for MT-MMP-1 and MT-MMP-3 shows a completely different pattern in the tissues or cell level. This shows that MT-MMP-1 and MT-MMP-3 are subject to different expression controls although they have the similar structure and function.

Example 3

Preparation of Monoclonal Antibodies

[0235] (a) Preparation of Antigen Polypeptides

[0236] For sequences specific to MT-MMP-3 in which their homology to the other MMP family is low, the following four sequences were selected from the amino acid sequence of MT-MMP-3 as described in SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing, and synthesized:

[0237] (SEQ ID NO: 5)

QTRGSSKFHRRKR

[0238] (corresponding to Sequence: Gln to Arg of SEQ ID NO: 2; abbreviated as "polypeptide A")

[0239] (SEQ ID NO: 6)

EEVPYSELENGKRD

[0240] (corresponding to Sequence: Glu to Asp of SEQ ID NO: 2; abbreviated as "polypeptide B")

[0241] (SEQ ID NO: 7)

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

19

PTSPRMSVVRSAETMQSA

[0242] (corresponding to Sequence: Pro⁵⁵ to Ala⁷² of SEQ ID NO: 2; abbreviated as "polypeptide C")

[0243] (SEQ ID NO: 8)

TLGNPNHIDGNDLFL

[0244] (corresponding to Sequence: Thr²²⁹ to Leu²⁴² of SEQ ID NO: 2; abbreviated as "polypeptide D").

[0245] These peptides were synthesized using a peptide synthesizer (peptide synthesizer 9600, MilliGen/Bioscience) with Fmoc-bop techniques. Cysteine was introduced on the N-terminus of each polypeptide. The synthetic peptides were purified with high performance liquid chromatography using μ Bondasphere, C18 column (Waters).

[0246] (b) Preparation of Polypeptide-BSA Conjugates

[0247] Each peptide was coupled with bovine serum albumin (BSA) via a cysteine residue to form an antigen-conjugate. BSA (20 mg) was dissolved in 2 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5. Also, 18.13 mg of N-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide was dissolved in 200 μ l of dimethylformamide. A mixture of the BSA solution and the N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide solution was reacted at 30° C. for 30 min., and then subjected to gel filtration through PD-10 (Pharmacia) equilibrated with a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. Maleimido-coupled BSA fractions were collected and concentrated to 1.5 ml or less. Each synthetic polypeptide obtained in the above (a) (molar ratio of polypeptide: maleimido-coupled BSA = 50: 1) was dissolved in 1 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, then mixed with the maleimido-coupled BSA thus prepared. The mixture was incubated at 4° C. for 20 hours to form a BSA-polypeptide conjugate.

[0248] (c) Preparation of Antibody-Producing Cells

[0249] An eight-week old female Balb/c mouse was primarily immunized by administering intraperitoneally 200 μ g of each BSA-polypeptide conjugate (conjugate of BSA with any of four polypeptides A, B, C, and D, prepared in the above (b) step) together with complete Freund's adjuvants. Eighteen days later, 200 μ g of each BSA-polypeptide conjugate dissolved in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, was administered intraperitoneally to the primarily immunized mouse for additional immunization. Further 32 days later, 100 μ g of each BSA-polypeptide conjugate was administered intraperitoneally to the mouse for final immunization in the similar manner to that during additional immunization. Next three days later, the spleen was taken out, and the spleen cell suspension was prepared.

[0250] (d) Cell Fusion

[0251] (1) The following materials and methods were used:

[0252] RPMI-1640 medium:

[0253] To RPMI-1640 (Flow Lab.) were added sodium bicarbonate (24 mM), sodium pyruvate (1 mM), penicillin G potassium (50 U/ml), amikacin sulfate (100 μ g/ml), and the mixture was adjusted pH to 7.2 with dry ice, sterilized and filtered through a 0.2 μ m Toyo Membrane Filter.

[0254] NS-1 medium:

[0255] To the above RPMI-1640 medium was added sterilized and filtered FCS (M. A. Bioproducts) until a concentration of FCS reached 15% (v/v).

[0256] PEG 4000 solution:

[0257] To RPMI-1640 medium was added polyethylene glycol 4000 (PEG 4000, Merck & Co.) until a concentration of PEG 4000 reached 50% (w/w). Thus, the serum-free solution was prepared.

[0258] Cell fusion using 8-azaguanine-resistant myeloma SP2 cells (SP2/0-Ag14) was carried out by slightly modified methods according to Oi, et al. techniques disclosed in "Selected Method in Cellular Immunology pp.351 to 372 (ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi), W. H. Freeman and Company (1980)".

[0259] (2) Described below is cell fusion between murine nucleated spleen cells immunized with polypeptide A-BSA conjugates and myeloma SP2 cells.

[0260]

[0261] The respective nucleated spleen cells (viable cell rate: 100%) prepared in the foregoing (c) were fused with myeloma cells (viable cell rate: 100%) in a ratio of 5:1 according to the following procedure:

[0262] The polypeptide A-immunized spleen cell suspension and the myeloma cells were washed respectively with a RPMI 1640 medium followed by resuspending in the same medium. For fusion, 1.1×10^9 nucleated spleen cells and 2.1×10^8 myeloma cells were mixed together. The cell suspension was pelleted by centrifugation and the supernatant fluid was completely aspirated off. To the cell pellet was added 7.1 ml of PEG 4000 solution (RPMI 1640 medium containing 50% (w/v) polyethylene glycol 4000) pre-warmed to 37° C. dropwise for 1 min., and stirred for 1 min. to allow the cells to be resuspended and dispersed. Next, after 14.2 ml of 37° C. pre-warmed RPMI 1640 medium was added dropwise for 2 min., 49.7 ml of the same medium was added dropwise within 2 to 3 min. with stirring to allow the cells to be dispersed. This cell dispersion was centrifuged, and the supernatant fluid was completely aspirated off. To the cell pellet was added 71 ml of 37° C. pre-warmed NS-1 medium (RPMI 1640 medium supplemented with filtered sterile 15% (w/v) fetal calf serum (JRI J Bioscience)) quickly, and a large cell mass was carefully dispersed by pipetting. Next, the cell suspension was diluted with 142 ml of the same medium, and 6.0×10^5 cells/0.1 ml was plated on each well of a polystyrene 96-well microtiter tray. The cell-containing microwell was incubated at 37° C. under a 100% humidified atmosphere containing 7% CO₂/93% air.

[0263] For mouse-derived spleen cells immunized with the polypeptide B-BSA conjugate, the spleen cells (6.2×10^8 cells) were mixed with 1.24×10^8 myeloma cells, and PEG 4000 solution, RPMI 1640 medium, and NS-1 medium as used above were used by 4.1 ml, 36.9 ml, and 123 ml, respectively.

[0264] For mouse-derived spleen cells immunized with the polypeptide C-BSA conjugate, the spleen cells (3.6×10^8 cells) were mixed with 7.5×10^7 myeloma cells, and PEG 4000 solution, RPMI 1640 medium, and NS-1 medium were used by 2.5 ml, 22.5 ml, and 75 ml, respectively.

[0265] For mouse-derived spleen cells immunized with the polypeptide D-BSA conjugate, the spleen cells (6.0×10^8 cells) were mixed with 1.2×10^8 myeloma cells, and PEG 4000 solution, RPMI 1640 medium, and NS-1 medium were used by 4.0 ml, 36.0 ml, and 120 ml, respectively.

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

20

[0266] (c) Selective Growth of Hybridomas in Selection Medium

[0267] (1) Media to be used were as follows:

[0268] HAT medium: To NS-1 medium as described in foregoing

[0269] (d) (1) was added further hypoxanthine (100 μ M), aminopterin (0.4 μ M), and thymidine (16 μ M).

[0270] HT medium: The medium has the same composition as the foregoing HAT medium except that aminopterin was excluded.

[0271] (2) Next day (first day) from culture initiation of the foregoing (d), two drops of HAT medium (approximately 0.1 ml) was added to the cells with a Pasteur pipette. On the 2nd, 3rd, 5th, and 8th days, a half of the medium (approximately 0.1 ml) was replaced with fresh HAT medium, respectively. On the 11th day, a half of the medium was replaced with fresh HT medium. On the 14th day, positive wells were examined by solid phase-antibody binding test (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) for all wells wherein the growth of hybridomas was visually recognized.

[0272] Polystyrene 96-well plates were coated with polypeptides A, B, C, and D, respectively, used as an antigen, and washed with PBS (containing 0.05% Tween 20) for washing to remove unadsorbed peptides. Next, the uncoated portions of each well were blocked with 1% BSA. To each polypeptide-coated well was added 0.1 ml of supernatant fluid from the hybridoma well in which hybridomas were grown and the polypeptide-coated well was allowed to stand at room temperature for approximately one hour. To the polypeptide-coated well was added, as a second antibody, horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-mouse immunoglobulin (Cappel Lab.), and the well was further allowed to stand at room temperature for approximately 1 hour. Next, to the well was added substrates, hydrogen peroxide and o-phenylenediamine, and OD readings at 492 nm were obtained by a microplate OD reader (MRP-A4, Toso, Japan).

[0273] (f) Cloning of Hybridomas

[0274] Hybridomas in the well positive against each antigen peptide obtained in the foregoing (e) were cloned by limiting dilution to establish monoclones.

[0275] That is, a cloning medium containing, as feeder cells, 10^7 mouse thymocytes per 1 ml of NS-1 medium was prepared. Into a 96-well microtiter tray was plated hybridomas at a cell density of 5, 1, or 0.5 cells per well, respectively, with dilutions wherein the 5, 1, or 0.5 hybridoma cells per well was plated to 36, 36, and 24 wells, respectively. On the 5th and 12th days, about 0.1 ml of NS-1 medium was added to all the wells. Approximately two weeks later from the initiation of cloning, ELISA as described in the above (e) was conducted for groups wherein the sufficient growth of hybridomas was visually recognized and the rate of colony formation-negative wells is 50% or more. In cases where all the examined wells were negative, 4 to 6 wells each containing 1 colony were selected from antibody-positive wells, and recloned. Finally, as shown in Tables 1 to 4, 7 anti-polypeptide A antibody-producing, 16 anti-polypeptide B antibody-producing, 11 anti-polypeptide C antibody-producing, and 4 anti-polypeptide D antibody-producing hybridoma cells were obtained, respectively.

[0276] (g) Cultivation of hybridomas and Purification of Monoclonal Antibodies

[0277] Each hybridoma cell thus obtained was cultured in NS-1 medium to afford monoclonal antibodies with a concentration of 10 to 100 μ g/ml in the culture supernatant. Further, 10 hybridoma cells thus obtained were administered intraperitoneally to a mouse (inbred BALB/c mouse, ♀, six-week old) intraperitoneally primed with pristane 1 week prior to injection, and one or two weeks later an ascitic fluid containing 4 to 7 mg/ml monoclonal antibody was collected. The obtained ascitic fluids were salted out with 40% ammonium sulfate saturation, IgG class antibodies were adsorbed on protein A affigel (Bio-Rad), followed by elution with a 0.1 M citrate buffer (pH 5) to afford purified forms.

[0278] (h) Determination of Class and Sub-class for Monoclonal Antibody

[0279] To microtiter plates on which polypeptides A, B, C, and D were coated according to ELISA as described herein above, was added each supernatant obtained in the above (f). Next, after PBS washing, iso-type specific rabbit anti-mouse IgG antibodies (Zymed Lab.) was added. After PBS washing, horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (H+L) was added, and visualization was carried out with hydrogen peroxide and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzothiazolinic acid). As a result, the class and sub-class were determined. Finally, as shown in Tables 1 to 4, plural monoclonal anti-MT-MMP-3 antibody-producing hybridomas were obtained.

TABLE 1

Polypeptide	Clone No.	Subclass/Chain
A	116-1E7	γ 1/ κ
	116-2G6	γ 1/ κ
	116-6A11	γ 1/ κ
	116-7B2	μ / κ
	116-10E10	μ / κ
	116-11B2	μ / κ
	116-12E3	μ / κ

[0280]

TABLE 2

Polypeptide	Clone No.	Subclass/Chain
B	117-1F6	γ 1/ κ
	117-2H5	γ 1/ κ
	117-3B9	γ 1/ κ
	117-4E1	γ 1/ κ
	117-5A6	γ 1/ κ
	117-6C11	γ 1/ κ
	117-9H5	γ 1/ κ
	117-10C6	γ 1/ κ
	117-13B6	γ 2a/ κ
	117-14E3	γ 1/ κ
	117-15C5	γ 1/ κ
	117-16E10	γ 1/ κ
	117-17E10	γ 2b/ κ
	117-18D9	γ 1/ κ
	117-19D1	γ 1/ κ
	117-20B3	γ 1/ κ

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

21

[0281]

TABLE 3

Polypeptide	Clone No.	Subclass/Chain
C	157-3G4	γ 1/ κ
	157-4A5	γ 2b/ κ
	157-6F5	γ 1/ κ
	157-11E1	μ / κ

[0282]

TABLE 4

Polypeptide	Clone No.	Subclass/Chain
D	158-2D6	γ 2a/ κ
	158-3E12	γ 2a/ κ
	158-8E6	γ 1/ κ
	158-9F6	γ 2b/ κ
	158-11D10	μ / κ
	158-16F12	γ 1/ κ
	158-17F1	γ 1/ κ
	158-18D8	γ 1/ κ
	158-19F10	γ 1/ κ
	158-20D5	γ 2a/ κ
	158-21F11	γ 1/ κ

[0283] clone No. 117-4E1 has been deposited as from Jul. 5, 1995 (original deposit date) with NIBH and has been assigned the Accession Number FERM P-15031. The original deposit of the hybridoma 117-4E1 has been transferred to one under the Budapest Treaty by a request dated July 1, 1996 and is on deposit with the Accession Number FERM BP-5572 under the terms of the Budapest Treaty at NIBH.

[0284] (i) Specificity of Anti-MT-MMP-3 Monoclonal Antibody

[0285] The cross-reactivity each of monoclonal anti-MT-MMP-3 antibodies (clone Nos. 117-4E1, 157-6F5 and 158-8E6) wherein each antibody positively reacts with a human MT-MMP-3 peptide was examined by solid phase-antibody binding tests (ELISA), as described in the above (c), using as an antigen pro MMP-1 (Clin. Chim. Acta, 219: 1 to 14, 1993), pro MMP-2 (Clin. Chim. Acta, 221: 91 to 103, 1993), and pro MMP-3 (Clin. Chim. Acta, 211: 59 to 72, 1992), purified from the culture supernatant of human embryonal fibroblasts (NB1RGB), respectively; pro MMP-7 purified from the culture supernatant of human rectal carcinomas (CaR-1) (Cancer Res., 50: 7758 to 7764, 1990); pro MMP-8 from human neutrophils (Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371: Supplement, 295 to 304, 1990); or pro MMP-9 from the culture supernatant of human fibrosarcomas (HT1080) (J. Biol. Chem., 267: 21712 to 21719, 1992), respectively.

[0286] That is, polystyrene 96-well plates were used. Purified MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, and MMP-9 were added in 50 ng/well to each well, respectively, to coat the well. After the wells were washed with PBS for washing to remove unadsorbed antigens, uncoated portions of each well were blocked with PBS containing 3% skim milk. To each well was added each anti-MT-MMP monoclonal antibody with 1 μ g/well, and the well was allowed to stand at room temperature for approximately 1 hour. After the plates were washed, peroxidase-labeled goat anti-mouse immunoglobulin was added as a second antibody and further

was reacted at room temperature for approximately 1 hour. Next, substrates, hydrogen peroxide and o-phenylenediamine, were added, and optical density (OD) readings at 492 nm were obtained by a microplate OD reader (MRP-A4, Toso, Japan).

[0287] As a result, none of the anti-MT-MMP-3 monoclonal antibodies had reactivity with purified MMPs samples, other than MT-MMP-3.

[0288] The methods as described in Example 3 are repeated, by using, as an antigen, recombinant MT-MMP-3, for example, recombinant MT-MMP-3 obtained in Examples 4 and 5 described herein below, instead of the synthetic peptide antigen, to produce monoclonal anti-MT-MMP-3 antibodies similarly.

Example 4

Expression and Identification of Gene Products

[0289] To express MT-MMP-3 in animal cells as hosts, cDNA was ligated with an expression vector.

[0290] In this Example, pSG5 (Stratagene) containing the SV40 promoter, enhancer, poly A signal, small T antigen gene intervening sequence was used for the expression vector. The recombinant pBluescript™ (Stratagene) wherein cloned MT-MMP-3 gene was integrated and which were constructed in Example 1 (e) was cleaved with EcoRI to produce 2.1 kb insertion fragments which were inserted into the EcoRI site of eukaryotic expression vector pSG5 to form expression plasmid pSGMT2. Ligation was carried out in accordance with the protocols attached with ligation kits. African green monkey kidney-derived COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum and 2 mM glutamine. The cultured COS-1 cells were cotransfected with pSGMT2 and pSGT1 (TIMP-1 cDNA was cloned in pSG5) according to calcium phosphate techniques (Virology, 52: 456, 1973). For a control, COS-1 was transfected with pSG5 alone.

[0291] That is, to distilled water was added 2 a g of recombinant pSG5 or pSG5 alone, to which 60 μ l of 0.25 M CaCl_2 was added. Then 62.5 μ l of 2 X BBS solution (50 mM BES buffer (pH7.9) containing 2.8 mM Na_2HPO_4 and 280 mM NaCl) was added to the bottom of the tube. After mixing, the mixture was allowed to stand at room temperature for 30 minutes, until sufficient precipitation occurred. After the precipitates were dispersed by pipetting and added dropwise to COS-1 cells, the resultant cells were incubated in a CO_2 incubator for approximately 24 hours. Then the medium was removed, the cells were washed with PBS, followed by addition of fresh methionine-free DMEM supplemented with 30 μ Ci/ml ^{35}S -methionine. The cultivation was continued for 5 hours to label cell proteins with S. The cells and condition medium were separated by centrifugation, and the cells were incubated at 4° C. for 1 hour in a lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl buffer, pH7.5, containing 0.15 M NaCl, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM Triton X-100, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)). The cell lysates were centrifuged to recollect supernatants. Both the cell lysate supernatants and conditioned medium were reacted with anti-MT-MMP-3 polypeptide antibody clones Nos. 117-4E1 or 117-13B6 (obtained in Example 3), and for a

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

22

control with anti-TIMP-1 antibody clone No. 50-1H7 at 4° C. for 16 hours. Clone Nos. 117-4E1 or 117-13B6 antibody were selected because they have low non-specific reactivity among the anti-MT-MMP-3 monoclonal antibodies. To these antigen-antibody complexes was added protein A-coupled Sepharose™-4B (Pharmacia) and the mixture was incubated at 4° C. for 2 hours with stirring to carry out immunoprecipitation. Then, the Sepharose™-4B coupled with immunoprecipitated monoclonal antibodies was precipitated by centrifugation, and washed three times with a lysis buffer solution, and finally with a 0.05 M Tris-HCl buffer solution, pH6.8. To this washed Sepharose™-4B was added a SDS polyacrylamide electrophoresis sample buffer solution (50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5) containing 10% glycerol, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue) and the mixture was heated at 100° C. for 3 min., and then applied to 12% SDS polyacrylamide electrophoresis. After electrophoresis, the gel was detected using a Bioimage Analyzer BAS1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.). The results are shown in FIG. 3.

[0292] Both anti-MT-MMP-3 polypeptide mAbs 117-4E1 and 117-13B6 used were precipitated immunologically a 64-kDa protein specifically from the lysate of cells transfected with MT-MMP-3 genes. Neither of the mAbs was precipitated from that of cells transfected the control vector pSG5 wherein no MT-MMP-3 gene was included. The molecular size 64 kDa of the proteins detected in immunoprecipitation almost matched the molecule weight calculated from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in Sequence Listing.

[0293] In addition, three bands equivalent to molecular sizes 30, 33, and 52 kDa were detected only from cell lysates of cells transfected with MT-MMP-3 genes. However, none of these bands were detected in the control.

[0294] On the other hand, none of these proteins as immunoprecipitated from cell lysates were detected from the conditioned culture medium. To the contrary, TIMP-1 was a secretory protein. In fact, most of the expressed TIMP-1 was detected in the conditioned culture medium and it was confirmed that TIMP-1 was surely secreted outside the cells.

[0295] The foregoing results show that MT-MMP-3 is not easily secreted though the presence of a signal peptide is suggested from its amino acid sequence. This finding is very similar to the previous finding obtained by the present inventors in which MT-MMP-1 was expressed on the cell surface layer, but was not detected in the culture medium (Nature, 370; 61 to 65, 1994).

[0296] Since MT-MMP-3 cDNA is a full-length cDNA synthesized with reverse-transcriptase from mRNA, MT-MMP-3 can be mass-produced via transferring this cDNA to a suitable expression vector wherein *E. coli*, *bacillus subtilis*, yeasts, animal cells or the like are used as a host. In the Example in which pSGMT2 was introduced into COS-1, MT-MMP-3 is transiently expressed in the transformant COS-1; however, cell strains capable of producing the targets for a long period can be obtained using expression vectors having a suitable selection marker (for example, neo genes, dehydrofolate reductase genes, etc.) and introducing it into CHO cells or the like.

Example 5

Function of the C-terminal Hydrophobic Amino Acid Continuous Sequence of MT-MMP-3

[0297] (a) Preparation of Chimeric Protein (TIMP/MT-3) between MT-MMP-3 C-Terminal Hydrophobic Amino Acid Continuous Sequence and TIMP-1 and of Chimeric Protein (TIMP/MT-1) between MT-MMP-1 C-Terminal Hydrophobic Amino Acid Continuous Sequence and TIMP-1

[0298] Preparation of chimeric proteins between MT-MMP C-terminal hydrophobic amino acid continuous sequence and TIMP-1 was carried out according to techniques for preparation of chimeric proteins between MT-MMP-1 transmembrane domain and TIMP-1 in Cao, et al. (J. Biol. Chem. 13; 801 to 805, 1995).

[0299] cDNA fragments encoding the the amino acid sequence (Ala⁵⁵⁶ to Val⁶⁰⁴) containing MT-MMP-3 C-terminal hydrophobic amino acid sequence were amplified by PCR techniques and recollected. Similarly, cDNA fragments encoding the the amino acid sequence (Gly⁵³⁵ to Val⁵⁸²) containing MT-MMP-1 C-terminal hydrophobic amino acid continuous sequence were amplified by PCR and recollected. PCR amplification was carried out in the similar manner to that in Example 1(b).

[0300] Each DNA fragment thus obtained was ligated into the 3'-terminal side of TIMP-1 cDNA, and subjected to subcloning to pSG5. Thus, expression plasmid pSGTIM2 for TIMP-1/MT-3 chimeric protein was produced. Similarly, expression plasmid pSGTIM1 for TIMP-1/MT-1 chimeric protein was produced. Ligation was carried out in accordance with the protocols accompanying with the ligation kit.

[0301] Transfection of these plasmids into COS-1 was carried out in the similar manner to that described in Example 4. COS-1 cells cultured in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum and 2 mM glutamine were transfected with pSGTIM2, pSGTIM1, and pSGT1, respectively, by the calcium phosphate technique. As a control, COS-1 was transfected with pSG5 alone.

[0302] That is, to 2 a g of plasmid DNA was added 60 μ l of 0.25 M CaCl₂. Then 62.5 μ l of 2 X BBS solution (50 mM BES buffer, pH7.9 containing 2.8 mM Na 2EPO and 280 mM NaCl) into the bottom of the tube. After mixing, the mixture was allowed to stand at room temperature for approximately 30 min to form precipitates sufficiently. The precipitates were dispersed by pipetting and added dropwise to COS-1 cells, and then the mixture was incubated in a CO₂ incubator for approximately 24 hours. After removal of the medium, the cells were washed with PBS, to which then fresh methionine-free DMEM containing ³⁵S-methionine was added. The cultivation was continued for 5 hours to label cell proteins with ³²S.

[0303] The cells and the conditioned culture medium were separated each other by centrifugation, and the cells were incubated at 4° C. for 1 hour in a lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 0.15 M NaCl, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM Triton X-100, 1% NP-40, 1mM EDTA, and 1 mM PMSF), and supernatants were collected. The lysed cell supernatants and the conditioned culture medium were reacted with anti-TIMP-1 antibody, clone No. 50-1H7 (obtained in Example 3), at 4° C. for 16 hours.

[0304] To the antigen-antibody complexes thus obtained was added a protein A-coupled Sepharose™-4B (Pharmacia) and the mixture was incubated with stirring at 4° C. for 2 hours to carry out immunoprecipitation. The immunoprecipitated Sepharose™-4B coupled with the monoclonal antibody was precipitated by centrifugation, the precipitate was washed 3 times with a lysis solution, and then finally washed with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 6.8. To this washed Sepharose™-4B was added an SDS polyacrylamide electrophoresis sample buffer solution (50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.5 containing 10% glycerol, 2% SDS, 2% 8-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue) and the mixture was heated at 100° C. for 3 min., and then applied to 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. After the electrophoresis, signals of the gel were detected by a Bioimage Analyzer-BAS1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.).

[0305] TIMP-1, TIMP-1/MT-1, and TIMP-1/MT-3 were detected as 28, 32, and 32 kDa proteins in the cell lysate, respectively. The molecule sizes of the detected chimeric proteins TIMP-1/MT-1 and TIMP-1/MT-3 matched the molecule weights estimated from the construct of the fused genes. TIMP-1 was predominantly detected in the conditioned culture medium, though it was found in the cell lysate. However, TIMP-1/MT-1 was detected exclusively in the cell lysate, but not in the conditioned culture medium (J. Biol. Chem., 13; 801 to 805, 1995). TIMP-1/MT-3 was detected exclusively from the cell lysate, similar to TIMP-1/MT-1. The localization of TIMP-1/MT-3 was exactly the same as that of TIMP-1/MT-1 (FIG. 4).

[0306] These results show that the hydrophobic amino acid continuous sequence at the MT-MMP-3 C-terminal region suppresses secretion of the fusion proteins to the outside of the cells with a function similar to the hydrophobic amino acid continuous sequence at the MT-MMP-1 C-terminal region.

[0307] (b) Expression of Chimeric Proteins in Cell Surface Layers

[0308] It was examined whether in fact the hydrophobic amino acid continuous sequence in the MT-MMP-3 C-terminal region is functioning as a transmembrane domain by indirect immunofluorescence staining for TIMP-1/MT-3 expression cells. COS-1 cells were transfected with pSGT1 or pSGT1M2 by the calcium phosphate technique in the similar manner to that described in Example 4. In this Example, the cells were cultured on a slide chamber without using an isotope-labeled medium. After 24-hour culturing, the cells were reacted at 37° C. for 40 minutes in PBS containing 5 µg / ml anti-TIMP-1 antibody, clone No. 50-1H7, and 3% BSA. Then the cells were washed three times with PBS containing 3% BSA, air-dried, and fixed with acetone for 5 min. The cells were soaked in PBS containing 3% BSA, and then reacted with 1500x diluted fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (Capel) at 37° C. for 30 min. Then an excessive amounts of antibodies was washed out with PBS containing 3% BSA. Finally, the specimens were overlaid with glycerol and observed under a immunofluorescence microscope.

[0309] As a result, in pSGT1M2-expressing cells (chimeric protein TIMP-1/MT-3-producing cells), fluorescence was observed on the cell surface, confirming that the TIMP-1 portion of the chimeric protein was expressed on the cell

surface layer. On the other hand, no fluorescence was observed in pSGT1-expressing cells (non-chimeric TIMP-1-producing cells), and the expression of TIMP-1 was not observed on the cell surface layer (FIG. 5).

[0310] This result shows that the MT-MMP-3 C-terminal hydrophobic amino acid continuous sequence is functioning as a transmembrane (TM) domain.

Example 6

Activation of Pro MMP-2 due to Expression of MT-MMP-3

[0311] COS-1 cells were cotransfected with plasmid pSG5M2 for MT-MMP-3 cDNA as constructed in Example 4, plasmid pSG5M1 for MT-MMP-1 cDNA, or vector pSG5, respectively, together with plasmid pSGGA for pro MMP-2, by the calcium phosphate technique as described in Example 4. In the experiments, a conventional fresh medium was used instead of a fresh medium containing ³⁵S-methionine. In addition, human fibrosarcoma HT-1080 cell lines were cotransfected with pSGT1, pSGT2, or pSG5, respectively, together with pSGM2. In the immunoprecipitation experiments, it was confirmed that transformed HT-1080 cell lines secrete pro MMP-2 and pro MMP-9 constitutively (corresponding to 68 kDa and 97.4 kDa bands, respectively, in FIG. 6), and MT-MMP-3 cDNA-transfected cells express MT-MMP-3 (see: Example 4).

[0312] The transfectants thus obtained were cultured for 24 hours in serum-free DMEM, and the recollected culture supernatants were applied to zymography. The culture supernatants were mixed with a SDS polyacrylamide electrophoresis sample buffer solution (no-reducing agent; 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.5 containing 10% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue) and the mixture was incubated at 37° C. for 20 min., and applied to electrophoresis employing the following conditions: 20 mA, 4° C., 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin.

[0313] After electrophoresis, the gel was washed in a 2.5% Triton X-100 solution with gently shaking for 1 hour, and then incubated in a gelatinase buffer solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl, and 0.02% NaN₃) with slowly shaking at 37° C. for 24 hours. The buffer solution was discarded, and the gel was stained in 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 (dissolved in 50% methanol-10% acetic acid) for 1 hour, then was soaked in a decoloring solution (5% methanol- 7.5% acetic acid) and decolorized. The results of the zymography was shown in FIG. 6.

[0314] Similarly to that in MT-MMP-1 cDNA-transfected COS-1, 64 kDa and 62 kDa bands corresponding to activate intermediate MMP-2 and active MMP-2, respectively, were newly expressed in MT-MMP-3 cDNA-transfected COS-1. Thus, the activation of pro MMP-2 was confirmed. On the other hand, in vector pSG5-transfected cells, only 68 kDa band of pro MMP-2 was detected, but the molecule size change accompanied with activation was not observed (FIG. 6A).

[0315] For COS-1 cells, the pro MMP-2 activation due to the expression plasmid was observed by cotransfection of pro MMP-2 expression plasmid (pSGGA). For HT1080 that constitutively expresses pro MMP-2, the pro MMP-2 acti-

US 2001/0016333 A1

Aug. 23, 2001

24

vation accompanied with MT-MMP-3 expression was observed. The active form pro MMP-2 observed in this HT1080 has the same molecular size as the pro MMP-2 molecule induced by treating HT1080 cells with 100 μ g/ml concanavalin A, and was specifically reacted with monoclonal anti-MMP-2 antibody. This activation was not observed in control cells transfected with the vector alone. On the other hand, for pro MMP-9, the change of the molecule size was not recognized as was in the control cells, and the activation was not recognized.

[0316] The activation of pro MMP-2 was suppressed in TIMP-1 and MT-MMP-3-cotransfected cells. It was suppressed in TIMP-2 and MT-MMP-3-cotransfected cells, too. The inhibitory degree in the TIMP-2 co-transfected cells was more significant than that in the TIMP-1, and this tendency was similar in MT-MMP-1 and MT-MMP-3 (FIG. 6B).

[0317] In an embodiment, the present invention relates to:

[0318] (A) a protein or a salt thereof, which (i) has an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP, (ii) is a member of MMPs having the capability of activating pro MMP-2, (iii) is an activator for pro MMP-2, and (iv) is different from MT-MMP-1;

[0319] (B) the protein according to the above (A), wherein the protein has an activity or a primary structural, conformation identical with or substantially equivalent to that of MT-MMP-3 or a salt thereof; wherein the protein has activity substantially equivalent to MT-MMP-3 or its salt or has the primary structure conformation substantially equivalent thereto;

[0320] (C) the protein according to the above (A) or (B), wherein a C-terminal area of the protein has (i) an amino acid sequence from Ala⁵⁶¹ to Phe⁵⁸⁴ in the sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent thereto;

[0321] (D) the protein according to any of the above (A) to (C), wherein the protein is MT-MMP-3 or a salt thereof which has (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence equivalent thereto;

[0322] (E) the protein according to any of the above (A) to (D), wherein the protein is a product obtained by expressing a foreign DNA sequence in prokaryotes or eukaryotes;

[0323] (F) the protein according to any of the above (A) to (E), wherein the protein has (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) the substantially same amino acid sequence;

[0324] (G) a partial peptide (or a peptide fragment) or its salt of the protein according to any of the above (A) to (F);

[0325] (H) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence coding for the protein according to any of the above (A) to (F) or a partial peptide thereof;

[0326] (I) the nucleic acid according to the above (H) which is a DNA gene having a nucleotide sequence coding for MT-MMP-3 according to any of the above (B) to (D);

[0327] (J) the nucleic acid according to the above (H) or (I), having (i) an open reading frame region of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing or (ii) a nucleotide sequence having an activity substantially equivalent thereto;

[0328] (K) a vector comprising the nucleic acid according to any of the above (H) to (J);

[0329] (L) a transformant wherein the nucleic acid according to any of the above (H) to (J) or the vector according to the above (K) is harbored; and

[0330] (M) a process for producing the protein or its partial peptide according to any of the above (A) to (F), which comprises:

[0331] (i) culturing the transformant according to the above (L) in a nutrient medium capable of growing said transformant, and

[0332] (ii) producing, as a recombinant species, the protein or its partial peptide according to any of the above (A) to (F), including MT-MMP-3 or a salt thereof.

[0333] Such a protein or a partial peptide thereof, and a nucleic acid are labeled and can be used for measurement and examination.

[0334] In another embodiment, the present invention relates to:

[0335] (a) a method for producing an antibody against a species selected from the group consisting of a protein or a salt thereof and a peptide thereof or a salt thereof according to any of claims 1 to 6, including MT-MMP-3 or a salt thereof,

[0336] which comprises employing an antigen selected from the group consisting of said protein, said partial peptide and a salt thereof, and MT-MMP-3 or a salt thereof to raise the antibody thereagainst;

[0337] (b) an antibody against a species selected from the group consisting of a protein or a salt thereof according to any of claims 1 to 6, and MT-MMP-3 or a salt thereof,

[0338] (c) the antibody according to the above (b), wherein the antibody is an anti-serum;

[0339] (d) the antibody according to the above (b), wherein the antibody is monoclonal;

[0340] (e) the antibody according to the above (b) or (d), which is a monoclonal antibody against MT-MMP-3 or a salt thereof;

[0341] (f) a method for producing the antibody according to above (d) or (e), which comprises

[0342] (1) fusing an antibody-producing cell obtained from an immunized animal with an immortal cell, wherein said animal is immunized with a species selected from the group consisting of a protein or a salt thereof according to any of

claims 1 to 6, a partial peptide of said protein or a salt thereof, and MT-MMP-3 or a salt thereof, and

- [0343] (2) selecting an immortal hybrid cell capable of an antibody against a species selected from the group consisting of a protein or a salt thereof according to any of claims 1 to 6, and MT-MMP-3 or a salt thereof;
- [0344] (g) a method for detecting and/or measuring MT-MMP-3, which comprises using (A) a reagent selected from the group consisting of a protein or a salt thereof according to any of claims 1 to 6 and a partial peptide of said protein or a salt thereof, or (B) a reagent selected from the group consisting of the antibodies according to any of above (b) to (e);
- [0345] (h) a labeled antibody against MT-MMP-3 for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 (the detection and/or measurement of MT-MMP-3) according to above (g);
- [0346] (i) a labeled protein or a salt thereof, for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 (the detection and/or measurement of MT-MMP-3) according to above (g), wherein said labeled protein is a species selected from the group consisting of a protein or a salt thereof according to any of claims 1 to 6, and MT-MMP-3 or a salt thereof, or a labeled partial peptide of said protein or a salt thereof, for the method according to above (g);
- [0347] (j) a labeled nucleic acid for detection and/or measurement of MT-MMP-3 expressing cells and/or tissues, wherein said nucleic acid is a species according to any of claims 8 to 10; and
- [0348] (k) the nucleic acid according to above (j), which is a probe for hybridization.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0349] The protein or a salt thereof which (i) has an activity identical with or substantially equivalent to native MT-MMP that is a member of MMP capable of activating pro MMP-2, excluding MT-MMP-1, and (ii) is an activator for pro MMP-2 can be provided. Further, the nucleic acid encoding such proteins can be obtained. As a result, the diagnostic means useful for research & development regarding diagnosis and therapy of cancers including diagnosis of the presence or absence of tumor cells, estimation of malignancy of cancers or the like are provided. These are useful for the other medical and physiological applications. According to the present invention, there is provided: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed on the cell surface layer of human tumors in particular; a DNA containing a nucleotide sequence coding for said matrix metalloproteinase; host cells transformed with said DNA; a process for producing the matrix metalloproteinase using the transformed host cells; a monoclonal antibody specifically binding with the matrix protease protein; and use of these proteins and antibodies. These enable us to investigate a matrix protease specifically expressed on the cell surface layer as a target of anti-metastatic drugs and as a marker for detection of cancers, judgment of malignancy, diagnosis of cancers, etc. In addition, the present invention is helpful for

research of Alzheimer's diseases. Effective detection and therapeutic means is provided according to the present invention.

1. A protein or a salt thereof, which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1.
2. The protein according to claim 1, wherein the protein has a biological property or primary structural conformation identical with or substantially equivalent to that of native MT-MMP-3 or a salt thereof.
3. The protein according to claim 1 or claim 2, wherein a C-terminal area of the protein has (i) an amino acid sequence from Ala⁵⁶¹ to Phe⁵⁸⁴ in the sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent thereto.
4. The protein according to any of claims 1 to 3, wherein the protein is MT-MMP-3 or a salt thereof which has (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence equivalent thereto.
5. The protein according to any of claims 1 to 4, wherein the protein is the product of prokaryotic or eukaryotic expression of an exogenous DNA sequence.
6. The protein according to any of claims 1 to 5, wherein the protein has (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) the substantially same amino acid sequence.
7. A partial peptide of the protein according to any of claims 1 to 6 or a salt thereof.
8. A nucleic acid comprising a nucleotide sequence coding for the protein or the partial peptide according to any of claims 1 to 7.
9. The nucleic acid according to claim 8, which is a DNA gene having a nucleotide sequence coding for MT-MMP-3 according to any of claims 2 to 4.
10. The nucleic acid according to claim 8 or 9, having (i) an open reading frame region of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1 in the Sequence Listing or (ii) a nucleotide sequence having an activity substantially equivalent thereto.
11. A vector comprising the nucleic acid according to any of claims 8 to 10.
12. A transformant or transfectant harboring (i) the nucleic acid according to any of claims 8 to 10 or (ii) the vector according to claim 11.
13. A process for producing the protein according to any of claims 1 to 6 or a partial peptide thereof, which comprises:
 - (i) culturing the transformant or transfectant according to claim 12 in a nutrient medium capable of growing said transformant or transfectant, and
 - (ii) producing, as a recombinant species, the protein according to any of claims 1 to 6 or a partial peptide thereof, including MT-MMP-3 or a salt thereof;
14. An antibody against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof.

15. The antibody according to claim 14, wherein the antibody is against the protein which has an activity or a primary structural conformation identical with or substantially equivalent to that of MT-MMP-3 or a salt thereof.

16. The antibody according to claim 14 or 15, wherein the antibody is against the protein that is MT-MMP-3 or a salt thereof having (i) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) an amino acid sequence substantially equivalent thereto.

17. The antibody according to any of claims 14 to 16, wherein the antibody is against the protein which is a product obtained by expressing a foreign DNA sequence in prokaryotes or eukaryotes.

18. The antibody according to any of claims 14 to 17, wherein the antibody is against the protein which has (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 in the Sequence Listing or (ii) the substantially same amino acid sequence.

19. The antibody according to any of claims 14 to 18, wherein the antibody is against a partial peptide of the protein or a salt thereof.

20. The antibody according to any of claims 14 to 19, wherein the antibody is anti-serum.

21. The antibody according to any of claims 14 to 19, wherein the antibody is monoclonal.

22. The antibody according to any of claims 14 to 19 and 21, which is a monoclonal antibody against MT-MMP-3 or a salt thereof.

23. A method for producing an antibody against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof, which comprises employing an antigen selected from the group consisting of said protein, said partial peptide and a salt thereof to raise the antibody thereagainst.

24. A method for producing the antibody according to claim 21 or 22, which comprises

- (A) fusing an antibody-producing cell obtained from an immunized animal with an immortal cell, wherein said antibody is against (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation

capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof and said animal is immunized with the protein, the partial peptide or a salt thereof, and

- (B) selecting an immortal hybrid cell capable of an antibody against a protein including MT-MMP-3.

25. A method for detecting and/or measuring MT-MMP-3, which comprises using (A) a reagent selected from the group consisting of (a) a protein or a salt thereof which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, and (b) a partial peptide of said protein or a salt thereof, or (B) a reagent selected from the group consisting of the antibodies according to any of claims 14 to 22.

26. A labeled antibody against MT-MMP-3 for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 (the detection and/or measurement of MT-MMP-3) according to claim 25.

27. A labeled protein or a salt thereof, for the method for detecting and/or measuring MT-MMP-3 according to claim 25, wherein said labeled protein (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or a labeled partial peptide of said protein or a salt thereof, for the method according to claim 25.

28. A labeled nucleic acid for detection and/or measurement of MT-MMP-3 expressing cells and/or tissues, wherein said nucleic acid encodes (A) a protein which (i) belongs to a member of MMPs having the activation capability of pro MMP-2, (ii) has an activity identical with or substantially equivalent to naturally-occurring MT-MMP, and (iii) is a pro MMP-2 activating factor, excluding MT-MMP-1, or (B) a partial peptide of said protein.

29. A nucleic acid according to claim 28, which is a probe for hybridization.

* * * * *